



Universidad Nacional de Rosario

Facultad de Ciencias Médicas

Tesis de doctorado

“Desarrollo de metodologías para el rescate de órganos de donantes a corazón parado. La perfusión hipotérmica y su posible aplicación al trasplante hepático”.

Lic. Matías Emanuel Carnevale

Director: Dr. Joaquin V. Rodriguez

Codirector: Dr. Gabriel E. Gondolesi

**CENTRO BINACIONAL (ARGENTINA-ITALIA) DE INVESTIGACIONES EN
CRIOBIOLOGÍA CLÍNICA Y APLICADA**

Rosario – Argentina

2019

Desarrollo de metodologías para el rescate de órganos de donantes a corazón parado. La perfusión hipotérmica y su posible aplicación al trasplante hepático.

Matías Emanuel Carnevale
Licenciado en Genética, UNaM.

Este trabajo de tesis es presentado como parte de los requisitos para optar al grado académico de Doctor en Ciencias Biomédicas de la Universidad Nacional de Rosario y no ha sido presentada previamente para la obtención de otro título en esta u otra Universidad. La misma contiene los resultados obtenidos en investigaciones llevadas a cabo en el Centro Binacional (Argentina-Italia) de Investigaciones en Criobiología Clínica y Aplicada (CAIC), UNR; durante el período comprendido entre el 30 de agosto de 2013 y el 31 de diciembre de 2018, bajo la dirección del Dr. Joaquin V. Rodriguez.

Director Dr. Joaquin V. Rodriguez.....
Jurado.....
Jurado.....
Jurado.....
Defendida.....



A continuación se detallan todas las publicaciones y presentaciones a congresos donde los resultados y experiencia obtenidos durante el desarrollo de este trabajo de Tesis Doctoral fueron dados a conocer:

PUBLICACIONES:

- Matías E. Carnevale, Natalia Lausada, Leonardo Juan de Paz, Pablo Stringa, Martin Rumbo, Edgardo E. Guibert, Claudio Tiribelli, Gabriel E. Gondolesi, Joaquin V. Rodriguez. **"The novel BGP-HMP solution improves static cold storage and reduces ischemia-reperfusion injury in rat liver transplant"**. Liver Transplantation. En revisión.
- Petrenko A., Carnevale M.E., Somov A., Osorio J.S., Rodriguez J.V., Guibert E.E., Fuller B., Froghi F. **"Organ Preservation into the 2020's: the Era of Dynamic Intervention"**. Transfusion Medicine and Hemotherapy. Aceptado.
- Carnevale M.E., Balaban C.L., Guibert E.E., Bottai H., Rodriguez J.V. **"Hypothermic Machine Perfusion versus Cold Storage on the rescuing of livers from non-heart beating donor rats"**. Artif Organs. 2013 Nov;37(11):985-91. doi: 10.1111/aor.12235.

CONGRESOS:

- Carnevale M.E., Tomatis C., Osorio J.S., Guibert E.E., Rodriguez J.V. **"¿Es posible utilizar la solución Bes-Gluconato-Polietilenglicol (BGP-CS) para preservar tanto hepatócitos aislados como hígados para trasplante?"**. XII Jornadas de Ciencia y Tecnología. Rosario, Santa Fe, Argentina. Del 17 al 18 de octubre de 2018. Modalidad de presentación: poster.
- Carnevale M.E., Tomatis C., Osorio J.S., Guibert E.E., Rodriguez J.V. **"Is the Bes-Gluconate-Polyethylene Glycol (BGP-CS) solution suitable for the preservation of isolated hepatocytes and whole livers?"**. X Congresso Latino Americano de Órgãos Artificiais e Biomateriais (10° COLAOb). João Pessoa, Brasil. Del 22 al 25 de agosto de 2018. Modalidad de presentación: poster.
- Carnevale M.E., Marchetti N., Guibert E.E., Gondolesi G., Rodriguez J.V., Tiribelli C. **"Desarrollo de una nueva solución (BGP-CS) para la preservación estática (cold storage) de órganos para trasplante. II. Estudios en el hígado aislado y perfundido"**. XI Jornadas de Ciencia y Tecnología. Rosario, Santa Fe, Argentina. 18 de Octubre de 2017. Modalidad de presentación: poster.
- Osorio J.S., Carnevale M.E., Guibert E.E., Rodriguez J.V. **"Desarrollo de una nueva solución (BGP-CS) para la preservación estática (cold storage) de órganos para**

trasplante. I. Composición y parámetros fisicoquímicos". XI Jornadas de Ciencia y Tecnología. Rosario, Santa Fe, Argentina. 18 de Octubre de 2017.
Modalidad de presentación: poster.

- Marchetti N., Carnevale M.E., Juan de Paz L., Guibert E.E., Rodriguez J.V. **"Desarrollo de un minibiosensor para la determinación de L-Lactato (LAC) en muestras biológicas".** XI Jornadas de Ciencia y Tecnología. Rosario, Santa Fe, Argentina. 18 de Octubre de 2017.
Modalidad de presentación: poster.

- Carnevale M.E., Marchetti N., Guibert E.E., Gondolesi G., Rodriguez J.V., Tiribelli C. **"Desarrollo de una nueva solución (BGP-CS) para la preservación estática (cold storage) de órganos para trasplante. II. Estudios en el hígado aislado y perfundido".** XXIV Congreso Latinoamericano y del Caribe de Trasplante – STALYC. Congreso Uruguayo de Trasplante – SUT. Montevideo, Uruguay. Del 3 al 6 de Septiembre de 2017.
Modalidad de presentación: poster.

- Vecchio Dezillio L., Carnevale M.E., Stringa P., Lausada N., Guibert E.E., Rumbo M., Tiribelli C., Gondolesi G., Rodriguez J.V. **"Evaluación de una nueva solución de preservación (BGP-HMP) de desarrollo nacional en un modelo experimental de trasplante de intestino".** XXIV Congreso Latinoamericano y del Caribe de Trasplante – STALYC. Congreso Uruguayo de Trasplante – SUT. Montevideo, Uruguay. Del 3 al 6 de Septiembre de 2017.
Modalidad de presentación: oral.

- Osorio J.S., Carnevale M.E., Guibert E.E., Rodriguez J.V. **"Desarrollo de una nueva solución (BGP-CS) para la preservación estática (cold storage) de órganos para trasplante. I. Composición y parámetros fisicoquímicos".** XXIV Congreso Latinoamericano y del Caribe de Trasplante – STALYC. Congreso Uruguayo de Trasplante – SUT. Montevideo, Uruguay. Del 3 al 6 de Septiembre de 2017.
Modalidad de presentación: poster.

- Marchetti N., Carnevale M.E., Juan de Paz L., Guibert E.E., Rodriguez J.V. **"Desarrollo de un minibiosensor para la determinación de L-Lactato (LAC) en muestras biológicas".** 5to Taller de Órganos Artificiales, Biomateriales e Ingeniería de Tejidos. Maresias, SP, Brasil. Del 20 al 24 de Agosto de 2017.
Modalidad de presentación: poster.

- Lausada N., Carnevale M.E., Stringa P., Abate J.C., Vecchio Dezillio L., Machuca M., Rumbo M., Guibert E.E., Rodriguez J.V., Gondolesi G. **"Optimización de un modelo de trasplante hepático heterotópico en ratas para el estudio de preservación hepática prolongada".** XIII Congreso Argentino de Trasplantes. Mar del Plata, Buenos Aires, Argentina. Del 11 al 13 de Mayo de 2016.
Modalidad de presentación: poster.

- Osorio J.S., Carnevale M.E., Guibert E.E., Gondolesi G., Rodriguez J.V. **“Preservación estática de hígados de rata provenientes de donantes a corazón parado (NHB). Performance de la solución BGP-HMP versus la solución HTK”**. IX Jornadas de Ciencia y Tecnología. Rosario, Santa Fe, Argentina. 11 de Noviembre de 2015.

Modalidad de presentación: poster.

- Carnevale M.E., Osorio J.S., Guibert E.E., Gondolesi G., Rodriguez J.V. **“Liver cold static preservation in a non-heart beating (NHB) donor model in rat. The performance of BGP-HMP solution versus HTK solution”**. 4to Taller de Órganos Artificiales, Biomateriales e Ingeniería de Tejidos. Campina Grande, Brasil. Del 19 al 22 de Agosto de 2015.

Modalidad de presentación: comunicación oral.

- Carnevale M.E., Lausada N., Guibert E.E., Stringa P., Gambaro S., Rumbo M., Gondolesi G., Rodriguez J.V. **“Performance de una solución diseñada para Máquina de Perfusión Hipotérmica (HMP), empleada en preservación estática (CS) de hígados de rata para trasplante”**. VIII Jornadas de Ciencia y Tecnología. Rosario, Santa Fe, Argentina. 9 de Octubre de 2014.

Modalidad de presentación: poster.

- Carnevale M.E., Lausada N., Guibert E.E., Stringa P., Gambaro S., Rumbo M., Gondolesi G., Rodriguez J.V. **“Preliminary studies on the performance of a Hypothermic Machine Perfusion Solution (HMP) in cold static preservation (CS) of rat livers for transplant”**. VIII Congresso Latino Americano de Órgãos Artificiais e Biomateriais (8° COLAOB). Rosario, Argentina. Del 20 al 23 de agosto de 2014.

Modalidad de presentación: poster.

- Carnevale M.E., Méjico G., Balaban C.L., Guibert E.E., Rodriguez J.V. **“24 Horas de Perfusión Hipotérmica en Hígados de Ratas: Efectos Sobre la Composición de la Bilis”**. VII Jornadas de Ciencia y Tecnología. Rosario, Santa Fe, Argentina. 17 de Octubre de 2013.

Modalidad de presentación: poster.

- Carnevale M.E., Méjico G., Balaban C.L., Guibert E.E., Rodriguez J.V. **“24 Hours of Hypothermic Machine Perfusion of Rat Livers. Effects on Bile Composition”**. 3er Taller de Órganos Artificiales, Biomateriales e Ingeniería de Tejidos. Viña del Mar, Chile. Del 26 al 28 de Septiembre de 2013.

Modalidad de presentación: poster.

- Carnevale M.E., Méjico G., Balaban C.L., Guibert E.E., Bottai H., Rodriguez J.V. **“Rescate de hígados provenientes de ratas donantes a corazón no batiente (NHBD). Perfusión hipotérmica vs. Preservación estática”**. VI Jornadas de Ciencia y Tecnología. Rosario, Santa Fe, Argentina. 14 de Noviembre de 2012.

Modalidad de presentación: poster.

- Carnevale M.E., Balaban C.L., Guibert E.E., Rodriguez J.V. **“Hypothermic Machine Perfusion versus cold storage on the rescuing of livers from non-heart beating donor rats”**. VII Congresso Latino Americano de Órgãos Artificiais e Biomateriais (7° COLAOB). Natal, Brasil. Del 22 al 25 de agosto de 2012.

Modalidad de presentación: comunicación oral.

- Carnevale M.E., Balaban C.L., Guibert E.E., Bottai H., Rodriguez J.V. **“Evaluation of a new solution for Hypothermic Machine Perfusion (HMP) of the liver. II - A study in the perfused rat liver in vitro”**. 49th meeting of the Society for Cryobiology, Rosario, Argentina. Del 3 al 6 de Junio de 2012.

Modalidad de presentación: poster.

- Pascucci F.A., Carnevale M.E., Balaban C.L., Mamprin M.E., Guibert E.E., Rodriguez J.V. **“Evaluation of a new solution for Hypothermic Machine Perfusion (HMP) of the liver. I - Composition and physicochemical parameters”**. 49th meeting of the Society for Cryobiology, Rosario, Argentina. Del 3 al 6 de Junio de 2012.

Modalidad de presentación: poster.

AGRADECIMIENTOS

Joaquin, el jefe, confió en mí desde el primer momento (ayudado por un Angelito), en mi forma de trabajo y en mi formación. Le agradezco mucho haberme guiado como investigador de libro, autodidacta, a tener criterio y mucha convicción, a pensar que siempre se pueden hacer las cosas de una u otra manera. En todo momento me dio libertad y estuvo a mi lado ante cualquier requerimiento. Envidio el empuje que tuviste y como peleaste por lo que te gusta, envidio tu determinación y para mí sos un referente como investigador. Fuiste un gran director, un buen jefe y compañero. Ahora que ya estás jubilado puedo decirte que en algunos momentos me sentí apañado como un hijo adoptivo.

Edgardo, prácticamente otro director en este trabajo. Un oído siempre predispuesto para cualquier cosa que necesité y muy pendiente de mí trabajo. Agradezco mucho tu confianza, compartir las cosas de la vida y siempre considerarme para nuevos proyectos laborales y aquellos off road. No me quiero olvidar agradecerte haberme confiado tu asador.

Mis compañeros/as del CAIC, amigos/as con quienes pasamos muchos momentos lindos y pilares fundamentales en el trabajo. Les quiero agradecer por su compañerismo gigante, buena onda y por su solidaridad. Siempre presentes para lo que sea. **Leo**, amigo incansable, oído confidente, socio y compañero de aventuras; que el camino nos siga manteniendo unidos. **Cele**, grandiosa compañera, consejera, la voz del equilibrio; importante ayuda en momentos de crisis mutua. **Juli y Carla**, leoninas de carácter fuerte, siempre atentas, dispuestas y trabajadoras; **Lu**, buena onda, predispuesta a compartir su formación. Gracias a todos/as por hacerme sentir en casa. **Norita**, que persona optimista y alegre, siempre con ganas de hacer sentir bien al otro, muchas gracias por tu ayuda cada vez que te necesité. **Dani**, amigazo fiel, excelente persona en la que puedo confiar y pedir lo que sea; tu amistad es un gran logro de este trabajo. No me quiero olvidar de todas mis ex compañeros/as del laboratorio, fenomenales personas que siempre brindaron su compañerismo y amistad. Una salvedad para **Ceci**, guía indiscutible en los primeros años del trabajo y gran amiga; para **Guadi y Noe**, me permitieron compartir mi experiencia, hacer mis primeros pasos como orientador en la ciencia y enriquecerme trabajando juntos.

Gabriel y todo su grupo; muchas gracias por compartir su forma de trabajo, sus conocimientos y contribuir en mi formación para mirar las cosas desde otro punto de vista. GG, admiro tu empuje, ímpetu y enorme profesionalidad, gracias por tu confianza y por todo lo compartido. Chicos, gracias por la buena onda y por escucharme siempre.

Gustavo, Francisco y todo el bioterio de la FCM. Mil gracias por responder a todas mis urgencias, pedidos y confiar en nuestro trabajo. Más allá de eso, siempre me sentí muy a gusto de trabajar con ustedes, espero que sigan así, mejorando y que los proyectos continúen.

Alfredo R, docentes y compañeros del **Doctorado en Ciencias Biomédicas**, agradezco la buena predisposición, la energía transmitida, el buen criterio y el profesionalismo con el que se trabaja. Sin dudas una contribución enorme en mi formación y en mi carrera.

Mi **familia**, responsables y partícipes de todos mis logros. Mis **padres** nunca cuestionan, siempre me apoyan, siempre creen en mi capacidad y me demuestran su amor; les dedico este trabajo, en parte es de ellos. Mis **hermanas** son unas genias, me consienten y me hacen sentir importante, les deseo lo mejor siempre, mi amor para ellas es infinito. **Nachito**, el más chico de todos, te extraño siempre a montones, muchas gracias por hacerme seguir siendo un niño. Mi abuela **Baby**, siempre atenta, siempre preocupada por mi bienestar, me hace sentir consentido. Mis queridos **abuelos** que ya no están, los extraño mucho; aquí estoy finalizando ese trabajo del cual tanto preguntaban y hacían lo posible por entender, también es para ustedes.

A todo el resto de mi familia, siempre que volví a Paiva, Santa Fe, o cualquier lugar donde estuviera se preocuparon por mí y siempre estuvieron atentos a mis cosas. Muchas Gracias a todos/as.

Elii, mi compañera. Se aguantó la etapa más difícil del doctorado, supo apoyarme y entenderme. Muchas gracias por todo lo compartido, por hacerme viajar y por aguantar todas las idas y vueltas para que lo nuestro funcione. Tu confianza, amor y respeto son la energía que me hace seguir y creer que todo es posible.

Lucía y Chiro, mis amigas y colegas, confidentes y consejeras. Muchas gracias por apoyarme, ayudarme, hacerme sentir querido y por compartir su amistad.

A mis **amigos** de Rosario! **Botti, Jime y Quique**; personas increíbles, atentas y muy buenos amigos. En la tesina y en el doctorado, siempre con su oído, consejos y buena onda. Que nuestra amistad perdure y se agigante. **Vikingos**, hermanos de la vida, muchas gracias por todos los momentos compartidos, por adoptarme cuando llegué y por su amistad invaluable.

Querido donante:

Y cuando digo "querido", lo digo literal. Te tengo instalado en el alma. Allí te quedaste para siempre. Incluso desde antes de que aparecieras, no ha habido un solo día en el que haya dejado de pensar en ti y en tu familia. Y luego de que, por fin, llegaste, ha sido inevitable quererte más. Y agradecerte. Todos los días, a toda hora.

A estas alturas es importante que sepas que la primera palabra que aprendió a decir Federica fue "gracias". Mi hija es una muchacha agradecida. E inteligente y cómica e infinitamente crítica. Pero cuando la beso en la frente y respiro hondo, le sigo encontrando el mismo olor de cuando era bebé. Y los mismos ojitos dorados, como de gatita perdida y recién encontrada. O de pez. O de hoja de árbol a las 5 de la tarde.

Quizás haya sido tu mamá quien recibió el anuncio terrible que hizo que poco después yo también recibiera la llamada que me hizo agarrar a mi muchacha por un brazo y correr al hospital a recibir tu hígado. Y por eso te doy las gracias con toda mi alma. No sé si la donación de órganos era un asunto que ya habías hablado en familia pero, por ti, mi hija volvió a nacer. Gracias a ti y a la generosidad de tu familia, mi hija, mi familia entera y yo tenemos otra oportunidad para querernos más y mejor. Para entendernos desde la fragilidad y la esperanza, pero también desde la perseverancia y la fortaleza.

Te multiplicaste. Ya eres parte de lo que somos. Vamos a honrar y agradecer tu vida en cada gesto. Vamos a celebrarte todas las mañanas. Gracias, querido donante, todas las gracias. Salvaste la vida de mi hija y para eso no hay gracias que alcancen.

Testimonio de una madre que narra de qué manera un trasplante de hígado le cambió la vida a ella y a su hija.

Por Adrián Bertorelli.

ÍNDICE

ÍNDICE.....	1
RESUMEN	3
INTRODUCCIÓN	4
EL HÍGADO: ANATOMÍA Y FUNCIONES.....	4
TRASPLANTE HEPÁTICO	8
<i>Contexto histórico</i>	<i>8</i>
<i>Procuración y preservación.....</i>	<i>9</i>
<i>Escasez de órganos, listas de espera crecientes.....</i>	<i>13</i>
<i>Donantes de órganos</i>	<i>13</i>
<i>Estrategias para el reacondicionamiento de los órganos.....</i>	<i>15</i>
SOLUCIONES DE PRESERVACIÓN	15
<i>Solución de la Universidad de Wisconsin (UW) o ViaSpan®.....</i>	<i>16</i>
<i>Solución Histidina-Triptófano-Cetoglutarato (HTK) o Custodiol®.....</i>	<i>17</i>
<i>Solución EuroCollins®</i>	<i>17</i>
<i>Otras soluciones.....</i>	<i>18</i>
<i>Solución BGP-HMP</i>	<i>18</i>
TÉCNICAS DE PRESERVACIÓN DE ÓRGANOS PARA TRASPLANTE	19
<i>Máquinas de perfusión.....</i>	<i>20</i>
Antecedentes de los sistemas de perfusión	22
Clasificación de las técnicas de perfusión de órganos	23
Características de la dinámica de la perfusión.....	26
Rol del O ₂ en la preservación hipotérmica.....	27
Viscosidad y presión coloidosmótica (oncótica).....	27
<i>Preservación estática (SCS, Simple Cold Storage)</i>	<i>29</i>
HIPÓTESIS DE TRABAJO.....	31
OBJETIVOS	32
OBJETIVO GENERAL	32
OBJETIVOS PARTICULARES.....	32
ABREVIATURAS Y SÍMBOLOS	33
ANGLICISMOS	34
MATERIALES Y MÉTODOS	35
REACTIVOS Y EQUIPAMIENTO	35
ANIMALES.....	37
PROCEDIMIENTOS QUIRÚRGICOS	38
<i>Procuración a corazón batiente. Modelo de donante clásico (DBD)</i>	<i>38</i>
<i>Procuración a corazón parado. Modelo de donante marginal (DCD).....</i>	<i>38</i>
TÉCNICAS DE PRESERVACIÓN.....	39
<i>Preservación hipotérmica estática o SCS (Simple Cold Storage)</i>	<i>39</i>
<i>Máquina de perfusión hipotérmica (HMP)</i>	<i>40</i>
Descripción de la máquina de perfusión hipotérmica (HMP) diseñada.....	40
Operación de la máquina de perfusión hipotérmica.....	46
SOLUCIONES DE PRESERVACIÓN EN FRÍO	47
<i>Solución Histidina, Triptófano y Cetoglutarato (HTK) CUSTODIOL®</i>	<i>47</i>
<i>Solución BGP-HMP y modificaciones.....</i>	<i>48</i>

Caracterización fisicoquímica de la solución de preservación BGP-HMP	48
Determinación de la capacidad buffer.....	48
Determinación del punto de congelamiento	51
Determinación voltamperométrica de la concentración de O ₂ disuelto en la solución de preservación/perfusión BGP-HMP	52
Estudios sobre la presión oncótica o coloidosmótica de la solución BGP-HMP.....	57
Estudios sobre la viscosidad (η) de la solución de preservación BGP-HMP.....	58
SISTEMA DE PERFUSIÓN DE HÍGADO DE RATA AISLADO (IPRL).....	59
<i>Parámetros estudiados durante la reperfusión normotérmica</i>	60
Resistencia intrahepática (RI)	60
Producción de bilis (PB).....	61
Consumo de oxígeno (ConsO ₂)	61
Síntesis de urea	62
Liberación de enzimas intracelulares (LDH, AST y ALT)	62
Contenido de glucógeno	63
Estudios histológicos.....	63
TRASPLANTE HEPÁTICO EXPERIMENTAL.....	64
<i>Cirugía y diseño experimental</i>	64
Cirugía en el donante.....	64
Cirugía de banco.....	66
Cirugía en el receptor.....	66
<i>Evaluación del daño sufrido por el injerto y lesión celular en el modelo de trasplante hepático heterotópico</i>	66
SOLUCIONES Y BUFFERS.....	68
ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	69
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	70
CARACTERIZACIÓN FISICOQUÍMICA DE LA SOLUCIÓN DE PRESERVACIÓN BGP-HMP	70
<i>Determinación de la capacidad buffer</i>	70
<i>Determinación del punto de congelamiento</i>	71
<i>Determinación voltamperométrica de la concentración de O₂ disuelto en la solución de preservación/perfusión BGP-HMP</i>	72
<i>Presión oncótica o coloidosmótica de la solución BGP-HMP</i>	75
<i>Viscosidad (η) de la solución de preservación BGP-HMP</i>	75
EVALUACIÓN DE LA TEMPERATURA ÓPTIMA DE PERFUSIÓN.....	77
PRIMEROS ESTUDIOS DE PERFUSIÓN HIPOTÉRMICA DE HÍGADOS DE RATA EMPLEANDO LA SOLUCIÓN DE PRESERVACIÓN BGP-HMP	81
MODELO DE DONANTE A CORAZÓN PARADO EN LA RATA (DCD)	87
<i>La HMP en la recuperación de órganos provenientes de DCD - Evaluación de la solución BGP-HMP en el sistema de perfusión hipotérmica HMP</i>	89
<i>HMP vs SCS. Comparación de diferentes técnicas de preservación de órganos empleando hígados provenientes de ratas DCD</i>	92
EXPERIENCIAS UTILIZANDO LA SOLUCIÓN BGP-HMP PARA LA PRESERVACIÓN DE HÍGADOS DE RATA POR LA TÉCNICA DE SCS	100
<i>Preservación por SCS: preservación de órganos DBD y DCD con la solución BGP-HMP</i>	101
<i>Modelo de trasplante hepático heterotópico auxiliar y reducido de rata</i>	106
DISEÑO DE UN SISTEMA DE PERFUSIÓN HIPOTÉRMICA PORTÁTIL Y AUTÓNOMO	111
CONCLUSIONES.....	115
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	117

RESUMEN

En la actualidad, el trasplante hepático representa la solución terapéutica predilecta en pacientes con falla hepática terminal. El constante aumento en la demanda de órganos para trasplante ha dado inicio a la expansión del criterio de selección de potenciales donantes, incluyendo a los órganos provenientes de donantes a corazón no batiente. Los mismos presentan alto riesgo de disfunción primaria como consecuencia del tiempo variable de isquemia normotérmica que atraviesan antes de la procuración. En los últimos años se ha reflatado la técnica de preservación por perfusión hipotérmica y actualmente se encuentran registros en innumerables artículos de resultados prometedores con órganos marginales. En la clínica son muy pocos los centros que la aplican para la preservación de hígados.

En la presente tesis se empleó un modelo de donante a corazón parado en ratas de laboratorio, utilizando la máquina de perfusión hipotérmica y una solución de preservación desarrollada en nuestro laboratorio. Este procedimiento se asoció con una mejora en la mayoría de los parámetros evaluados durante la reperfusión *in vitro* y en el trasplante heterotópico (resistencia intrahepática, producción biliar, consumo de O₂, liberación de enzimas al perfusato, etc), cuando se comparó con los resultados obtenidos en hígados preservados con una solución comercial.

INTRODUCCIÓN

“Los donantes son gente altruista, anónima que sienten la llamada de la solidaridad, generosos con aquellos que claman por una oportunidad para solucionar su problema de salud y deciden que a su muerte todos sus órganos sean compartidos con enfermos.”

Fragmentos extraídos del libro: “En memoria de nuestros donantes”
Dr. Miguel Ángel de Frutos Sanz.

INTRODUCCIÓN

EL HÍGADO: ANATOMÍA Y FUNCIONES

El hígado es el órgano más voluminoso del cuerpo y uno de los más importantes debido a las múltiples funciones metabólicas en las que interviene. Normalmente es de color marrón, presenta una superficie externa lisa y su peso aproximado es de 1500 g, constituyendo alrededor del 2% del peso de una persona adulta ¹ (Figura 1A).

Anatómicamente se encuentra situado en la parte superior derecha de la cavidad abdominal, justo por debajo del diafragma y presenta una consistencia esponjosa debido a la alta cantidad de ramificaciones del sistema microvascular. A diferencia de cualquier otro órgano, el hígado recibe el aporte de sangre de dos fuentes: el 80% le llega desde la vena porta y el 20% restante es sangre procedente de la arteria hepática. La vena porta suministra sangre venosa en condiciones de baja presión al hígado, mientras que la arteria hepática suministra sangre arterial a alta presión. Dado que el lecho capilar del tracto gastrointestinal ya extrae la mayoría del O₂, la sangre venosa portal tiene un bajo contenido de O₂. La sangre de la arteria hepática, por otro lado, se origina directamente desde la aorta y, por lo tanto, está saturada con O₂. La vena porta está formada por la unión de las venas esplénica y mesentérica superior (Figura 1B). En la mayoría de los casos, la arteria hepática común es una rama del tronco celíaco, junto con las arterias esplénica y gástrica izquierda. En ocasiones, la arteria hepática presenta vasos accesorios o de reemplazo que suministran sangre al hígado.

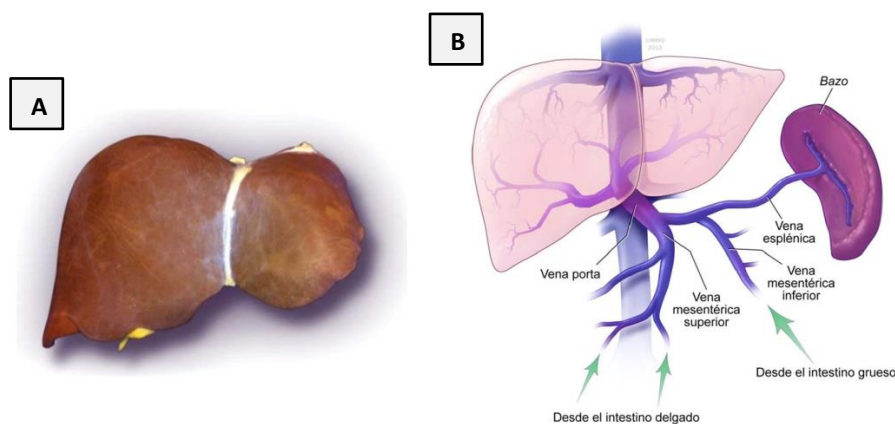


Figura 1. A) Fotografía de un hígado normal. **B)** Esquema representando el drenaje de la vena porta. Extraído de L. Sibulesky, 2013.

En el hígado se define una unidad estructural y funcional, el lobulillo hepático clásico. Es una unidad hexagonal, formada por cordones de hepatocitos en una disposición radial separados por los vasos sanguíneos, denominados sinusoides hepáticos. Los lobulillos hepáticos se ubican alrededor de una vena central o vena centro-lobulillar y en tres de los seis vértices del lobulillo hepático se localizan los espacios porta o tríadas portales, compuestos por una rama de la arteria hepática, una rama de la vena porta, un vaso linfático y un conductillo biliar; las ramas laterales de

estos vasos convergen a los sinusoides hepáticos donde la sangre arterial y venosa se mezcla y entra en contacto con los hepatocitos en el espacio de Disse. Los canalículos biliares formados entre dos hepatocitos adyacentes se extienden a lo largo de los cordones de hepatocitos hasta desembocar en el conductillo biliar de algún espacio porta (Figura 2) ²⁻⁴. La confluencia de las venas centrales constituyen las venas hepáticas que finalmente desembocan en la vena cava inferior ³. La sangre rica en nutrientes (vena porta) y la sangre rica en oxígeno (arteria hepática) se mezclan en los sinusoides hepáticos.

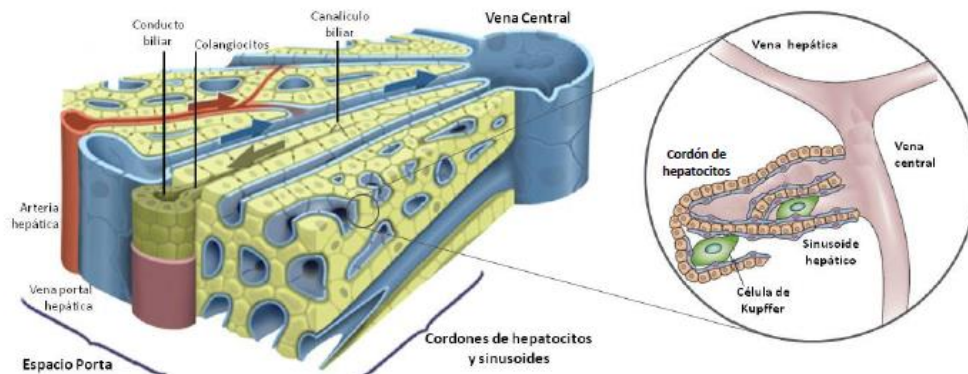


Figura 2. El lobulillo hepático. Los hepatocitos se ordenan en cordones y forman los canalículos biliares. La red de canalículos se conecta con los ductos biliares localizados en la triada portal que también comprende a la vena porta y la arteria hepática. En los sinusoides hepáticos convergen el flujo arterial y el flujo portal. Extraído y adaptado de A. Treyer y col, 2013 y de Y. Li y col, 2012.

En 1958, Rappaport realizó una división funcional del hígado y elaboró el concepto de acino hepático ⁵, el cual representa la mínima unidad funcional y estructural hepática. El acino se compone del parénquima hepático que se encuentra entre dos venas centrales y cuenta con ramificaciones terminales de la vena porta, arteria hepática y conductillo hepático terminal como eje. Cada triada portal es concebida como el centro, no la periferia, de una unidad microvascular funcional o acino, por lo que las células más cercanas al eje reciben un mayor suministro de sangre rica en oxígeno y nutrientes que las células de las zonas periféricas (Figura 3). En concordancia con lo anterior, las células de la zona periportal presentan menor predisposición a sufrir necrosis y mayor capacidad de regeneración que aquellas que se encuentran cercanas a la vena central ⁶.

Los hepatocitos son las células responsables de la mayor parte de las funciones de síntesis y metabólicas del hígado, poseen un gran tamaño (sección transversal promedio: 25-30 μm) y aspecto poligonal, conformando cerca del 80% de la masa hepática. Son células epiteliales polarizadas, lo que implica que en su membrana plasmática quedan definidos dos dominios de diferente composición y con funciones especializadas. La presencia de dicha polaridad les permite ejercer sus distintas funciones, ya que cada dominio está expuesto a distintos microambientes. Por un lado, el dominio basal o sinusoidal queda expuesto hacia los espacios sinusoidales, también

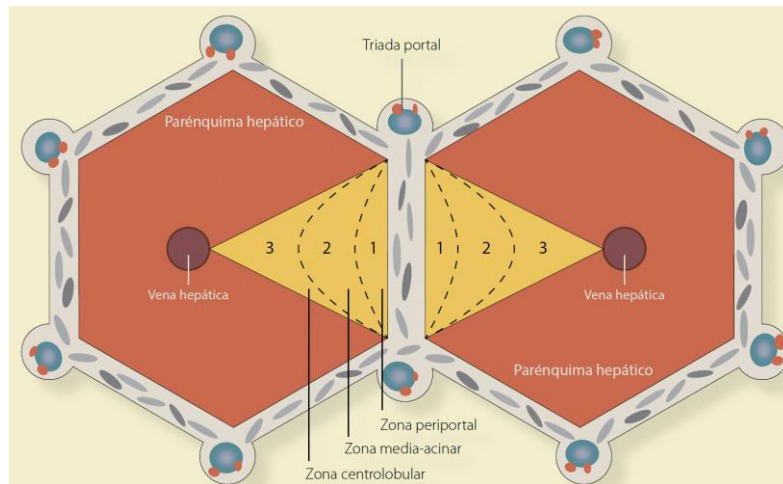


Figura 3. Acino hepático. Los mismos se encuentran divididos en tres zonas: Z1, Z2 y Z3. La Z3 tiene hepatocitos llamados perivenosos debido a la cercanía con la vena central. La Z2 se conoce como medio-acinar y se conecta con la Z1, que tiene hepatocitos periportales. Extraído de E.Y. Villegas-Serrano y col, 2017.

llamados espacios de Disse, los cuales permiten el acceso de los hepatocitos al flujo sanguíneo. La arquitectura del parénquima hepático es particular ya que carece de una lámina basal densa por debajo del endotelio sinusoidal. Esta característica genera que los hepatocitos se encuentren en contacto directo con componentes de la matriz extracelular ⁷. A través del dominio sinusoidal se produce la secreción de varios componentes a la circulación y también, la captación de sales biliares recicladas. Por otro lado, el dominio apical o canalicular se desarrolla en los sitios laterales de contacto hepatocito-hepatocito, formando el canalículo biliar. Éste puede ser compartido por más de dos células, posee extensas microvellosidades, se encuentra en contacto con el medio externo, y a través de éste se excreta la bilis ².

Por otro lado, el hígado cuenta con células no parenquimatosas, dentro de ellas se encuentran las células de Kupffer. Las mismas son macrófagos fijos que se encuentran en gran número en los sinusoides y que emiten sus prolongaciones hacia el espacio de Disse. Además de la fagocitosis, las células de Kupffer intervienen en la modulación de la respuesta inmune y la respuesta inflamatoria mediante la elaboración de mediadores químicos.

Otro tipo de células no parenquimatosas son las llamadas células de Pit, las mismas residen normalmente en el espacio sinusoidal asociadas a las células endoteliales, corresponden a una clase única de células “natural killer” encontradas en el hígado. Son linfocitos granulares grandes con actividad citotóxica sobre algunas células tumorales. En el espacio perisinusoidal o de Disse también se encuentra otra población celular, las células de Ito o estelares. Estas células almacenan lípidos y vitamina A, y cuentan con prolongaciones citoplasmáticas ricas en filamentos de actina que rodean el epitelio del sinusoide ejerciendo un efecto regulador sobre el flujo sanguíneo ⁴.

El hígado cumple diversas funciones para el organismo, a continuación se nombran algunas de ellas:

- **Producción de bilis:** los hepatocitos son los encargados de producir y secretar la bilis hacia la vía biliar, y de allí al duodeno, donde facilita la digestión de los alimentos.
- **Metabolismo de los carbohidratos:**
Gluconeogénesis es la formación de glucosa a partir de ciertos aminoácidos, lactato y glicerol.
Glucogenólisis es la fragmentación de glucógeno para liberar glucosa en la sangre.
Glucogenogénesis o glucogénesis. Conversión del exceso de glucosa en glucógeno para su almacenamiento.
- **Metabolismo de los lípidos:**
Síntesis de colesterol.
Producción de triglicéridos.
- **Producción de ciertas proteínas para plasma el sanguíneo:** albúmina y lipoproteínas.
- **Síntesis de factores de coagulación:** fibrinógeno (I), protrombina (II), globulina aceleradora (V), proconvertina (VII), el factor antihemofílico B (IX) y el factor Stuart-Prower (X).
- **Desintoxicación de la sangre:** neutralización de toxinas y de la mayor parte de los fármacos. Procesamiento de hemoglobina para el uso de su contenido de hierro (el hígado almacena hierro).
- **Eliminación de bilirrubina, también de glóbulos rojos.**
- **Transformación del amonio en urea:** conversión del amoníaco venenoso a urea (la urea es un producto final del metabolismo de las proteínas y se excreta en la orina).
- **Depósito de múltiples sustancias:** glucosa en forma de glucógeno, vitamina B12, hierro, cobre, etc.
- **Producción de glóbulos rojos:** en el primer trimestre del embarazo, el hígado es el principal órgano de producción de glóbulos rojos en el feto. A partir de la semana 12 de la gestación, la médula ósea asume esta función.

TRASPLANTE HEPÁTICO

Hoy en día el trasplante hepático es una terapia efectiva para los pacientes que sufren enfermedades crónicas que deterioran al hígado de manera irreversible. El mismo consiste en un proceso quirúrgico mediante el cual el hígado enfermo del paciente es reemplazado por un hígado sano proveniente de un donante cadavérico o un donante vivo. En el primero de los casos, por lo general suele tratarse de donantes con muerte encefálica, cuya actividad respiratoria y flujo sanguíneo se mantienen con asistencia mecánica hasta el momento de la procuración, mientras que el donante en vida cede una porción de su hígado al receptor, evidenciando esto, la extraordinaria capacidad regenerativa de este órgano.

Brevemente, el proceso de implantación del órgano involucra la anastomosis de la vena cava inferior, de la vena porta y de la arteria hepática en el cuerpo del receptor; una vez restaurado el flujo sanguíneo se reconstruye el conducto biliar.

El trasplante de hígado es potencialmente aplicable a cualquier patología hepática, ya sea aguda o crónica, donde exista una potencial pérdida de las funciones vitales del hígado (que puedan comprometer la vida del paciente). La mayoría de los trasplantados son pacientes con enfermedades crónicas e irreversibles del hígado (secundario a infección, toxinas, enfermedades autoinmunes, metabólicas, atresia biliar, etc.) o pacientes con un nivel considerado de cirrosis.

Contexto histórico

Las investigaciones en el área de los trasplantes comenzaron luego de que Carrel lograra realizar la primera técnica de anastomosis vascular a principios del siglo XX. De todas formas, recién en el año 1954 Murray pudo llevar a cabo de manera exitosa el primer trasplante en humanos. El mismo consistió en el trasplante de un riñón entre gemelos, teniendo la ventaja de no poseer inmunorreacción. En la década del 60, entre otras cosas, fue cuando se sentaron las bases en el campo de los trasplantes al introducir de manera exitosa la donación a partir de donantes cadavéricos. Se estandarizó el criterio médico-legal de muerte cerebral, en conjunto con la tecnología necesaria para mantener la perfusión y oxigenación de los tejidos en pacientes con muerte encefálica, esto proporcionó una fuente de órganos cadavéricos con un alto potencial de viabilidad post-trasplante ⁸.

El trasplante hepático en sí comienza a ser mencionado en la literatura médica mundial en el año 1955. Stuart Welch, del colegio médico de Albany, describió la colocación de un hígado auxiliar en un perro sin alterar la anatomía del hígado del receptor. El Dr. Thomas Starzl, para seguir con esos estudios metabólicos, había decidido e ideado que en lugar de colocar un trasplante auxiliar en un perro debería quitar el hígado completo del recipiente y poner uno nuevo. Esto permitiría obtener un hígado denervado sin colaterales, y apreciar realmente la influencia de flujo portal hepático sobre esta glándula. Esto se consiguió en junio de 1958, y para 1960, entre el Dr. Francis Moore (Boston) y el Dr. Starzl, ya tenían hechos 111 trasplantes hepáticos en perros.

Por esa época se aprendió dos prerrequisitos que eran indispensables para la sobrevivencia de los perros una vez que se llevaba a cabo el trasplante hepático. El primer requisito fue prevenir la lesión isquémica del injerto, y esto se había logrado en Boston

sumergiendo el hígado que se iba a colocar en solución salina helada. En el grupo de Starzl, por el contrario, esto se logró haciendo la infusión intravascular de la solución helada en el hígado que se iba a colocar. El segundo prerequisite que se había encontrado de vital importancia fue evitar el daño del sistema venoso esplácnico en el receptor, ya que el drenaje de este sistema se obstruía durante la hepatectomía y el pinzamiento, mientras se colocaba el nuevo hígado. Esto se logró evitar mediante el uso de un bypass veno-venoso externo.

Por otro lado, para ese tiempo ya se habían realizado seis trasplantes humanos de riñón de manera exitosa. Los pacientes, tanto el donador como el receptor, eran hermanos siameses, por un lado; y por otro lado, los seis habían sido tratados antes del trasplante con dosis subletales de radiación total del cuerpo para controlar o evitar el rechazo en ellos. En hígado esto no era posible, por lo que un mar de esperanza se abrió cuando se descubrió la droga llamada 6-mercaptopurina. Es interesante notar que en general para llegar al trasplante hepático, siempre se estuvieron apoyando en los resultados que se obtenían con el trasplante renal; primero en perros en el laboratorio y después en humanos. El primer trasplante hepático llegó allá por el año 1963 (Denver, Colorado) y fue realizado por el Dr. Thomas Starzl. El receptor sería un niño de 3 años con atresia biliar, al que se le implantó el órgano de otro niño fallecido como consecuencia de un tumor cerebral; murió a las cinco horas de acabar el trasplante. Dos meses después realiza el segundo en un hombre de 48 años con un cáncer de hígado, que recibe en este caso el órgano de un paciente de 55 años con un tumor cerebral. El paciente vive 22 días, pero muere por una embolia pulmonar.

La historia del trasplante de hígado está plagada de numerosos intentos en todo el mundo durante los sesenta y los setenta, pero con resultados muy pobres, que en las mejores manos apenas supone una supervivencia al año de un 30% de los pacientes. La mejoría en todos los programas de trasplantes de órganos se vieron con mayor optimismo una vez que apareció otro inmunosupresor, la ciclosporina, que se inició en Inglaterra en 1978 por el grupo de Calne. Esto mejoró aún más con la aparición del tacrolimus, que prácticamente sustituyó a la ciclosporina a principio de los noventa.

Una conferencia de consenso celebrada en Maryland en Junio de 1983 supuso la declaración del trasplante hepático como de utilidad terapéutica demostrada, y su verdadera difusión por todo el mundo. La supervivencia al año pasa del 30 al 70% y seguirá mejorando en las siguientes décadas ⁹.

En Argentina tendríamos que esperar hasta el 10 de enero de 1988 para celebrar el primer trasplante hepático, realizado en el Hospital Italiano de Buenos Aires por el equipo quirúrgico compuesto por los Doctores Eduardo de Santibañes, Miguel Ciardullo, Juan Mattera y Jorge Sivori, sentando las bases para el desarrollo de la cirugía hepatobiliopancreática y del trasplante.

Procuración y preservación

El proceso de procuración del órgano desencadena una serie de fenómenos deletéreos para el tejido como consecuencia de la isquemia (falta de irrigación sanguínea) y posterior restauración del flujo sanguíneo en el cuerpo del receptor (reperfusión) (figura 4). La injuria por isquemia-reperfusión (I/R) es un proceso complejo que genera daño a causa de la anoxia, de la producción de mediadores inflamatorios y de especies reactivas de oxígeno (EROs), conduciendo paso a paso a la

necrosis y apoptosis celular¹⁰. La lesión por anoxia es el evento predominante durante la isquemia, y las mitocondrias son las organelas más afectadas por el agotamiento del O₂. La disminución de la fosforilación oxidativa y producción de ATP desencadena una secuencia de eventos tales como alteraciones de la homeostasis de los iones celulares, activación de hidrolasas y pérdida de la función de barrera de la membrana. Todos estos eventos conducen a la muerte celular. Las secuelas de la injuria por I/R pueden asociarse frecuentemente con el retraso del funcionamiento o fallo primario del injerto.

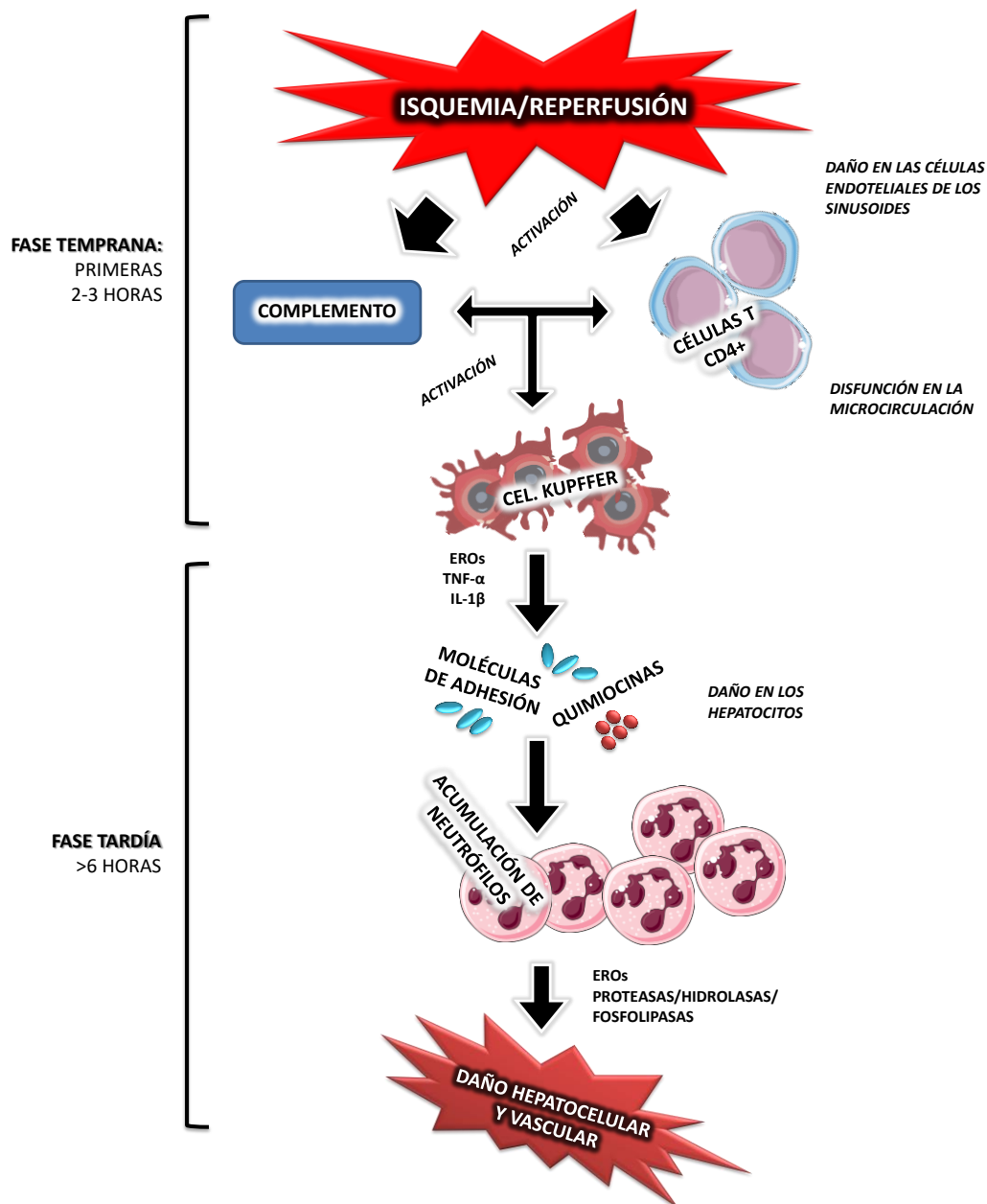


Figura 4. Fases de la injuria por isquemia/reperfusión hepática. La característica principal durante la fase temprana de la reperfusión es la activación de las células de Kupffer. La hipoxia en combinación con el complemento y los linfocitos T CD4 son los principales factores responsables de esta activación. Durante la fase tardía (>6 h), los mediadores inflamatorios aumentan la disfunción celular y vascular mediante la liberación de quimio atrayentes de neutrófilos e induciendo la expresión de moléculas de adhesión. La acumulación de neutrófilos aumenta el estrés oxidativo a través de EROs y la liberación de proteasas. Adaptado de M.I. Korontzi y col, 2010.

La preservación de órganos para trasplante constituye un aspecto fundamental en el proceso de procuración, permitiendo el desarrollo de tareas de logística como el transporte del órgano, organización de los equipos de cirugía, operativos multiorgánicos, etc. En este sentido, el descenso de la temperatura es un factor clave en la prevención del daño por isquemia, ya que el frío disminuye el metabolismo celular y los requerimientos de oxígeno, prolongando la viabilidad del tejido. Por otro lado, aunque fundamentalmente necesaria, la hipotermia también presenta repercusiones negativas en los tejidos que contribuyen a la injuria por I/R. Los dos tipos celulares más afectados durante la I/R hepática son los hepatocitos y las células endoteliales. Los hepatocitos son más sensibles al daño por isquemia caliente (37°C), mientras que, las células endoteliales son mayormente afectadas por la isquemia fría (4°C) durante el almacenamiento previo al trasplante ¹¹.

Los mecanismos intracelulares de injuria por I/R involucran los siguientes eventos principales (Figura 5):

- **Depleción de ATP:** durante la isquemia, el patrón metabólico cambia de aeróbico a anaeróbico, se detiene gradualmente la actividad metabólica celular dependiente de ATP, y la cantidad intracelular se agota rápidamente ¹². Aunque el descenso de la temperatura reduce el consumo de las reservas energéticas celulares, el ATP y ADP son gradualmente consumidos. La anaerobiosis genera lactato y H⁺ con la generación de 2 moléculas de ATP, pero el consumo residual de compuestos energéticos excede a la capacidad de las células de poder restaurarlos ¹¹.

- **Desbalance iónico:** la bomba Na⁺/K⁺ ATPasa mantiene la composición iónica del medio intracelular. La carencia de ATP y excesiva producción de iones H⁺ producto del metabolismo anaeróbico provocan la disfunción de la bomba. El desbalance iónico promueve la entrada de agua a la célula, generando la hinchazón de los hepatocitos, células de Kupffer y células endoteliales; esto genera el estrechamiento de los sinusoides y propicia la alteración microcirculatoria. El incremento de la concentración intracelular del ión Ca⁺² es otra consecuencia de la depleción de ATP; fenómeno que desencadena mecanismos de injuria a través de la activación de enzimas hidrolíticas involucradas en la conversión de la xantina deshidrogenasa en xantina oxidasa y la disrupción de las membranas celulares (formación de blebs) ¹¹.

- **Generación de especies reactivas del oxígeno (EROs):** el estrés oxidativo juega un papel clave en la lesión por reperfusión. La reoxigenación luego de un período de isquemia promueve la generación de EROs como el radical superóxido (O₂⁻) y el peróxido de hidrógeno (H₂O₂). Las principales fuentes productoras de EROs incluyen la xantina oxidasa, cuyo sustrato es la hipoxantina producto del catabolismo del ATP durante la isquemia; la NADPH oxidasa de las células de Kupffer activadas en respuesta al estrés por isquemia; y la cadena respiratoria de la mitocondria en estado reducido. Las EROs tienen como blanco a las proteínas, los lípidos y los ácidos nucleicos; están implicados en la formación de poros de permeabilidad en la membrana mitocondrial ¹³, y participan en la transducción de señales que coordinan la respuesta inflamatoria ¹⁴. También pueden dañar las células endoteliales y destruir la integridad de la microvasculatura ¹².

- **Desestabilización de las membranas celulares:** el frío altera el estado físico-químico de las membranas, modificando la viscosidad y alterando las funciones y permeabilidad de la misma. Además, alteraciones a nivel del citoesqueleto debido a la depleción de sustratos energéticos, en conjunto con la activación de lipasas y proteasas, contribuyen a la desestabilización de la superficie celular.

- **Inducción de la transcripción génica:** durante el período de isquemia (caliente/fría) las células sobrevivientes reprograman la expresión de sus genes. Uno de los factores de transcripción más importantes involucrados en la respuesta es el factor nuclear κB (NF- κB). Ante el estrés oxidativo este factor migra al núcleo e induce la transcripción de genes de citoquinas (IL-1 β , IL-6 y TNF- α , etc.) y moléculas de adhesión (ICAM-1) que promueven la respuesta inflamatoria reclutando neutrófilos y plaquetas, con la consiguiente congestión y deterioro del tejido ¹⁵. Por otro lado, las células también son capaces de inducir una respuesta adaptativa al estrés generado mediante la activación de factores de transcripción como el Nrf y el factor Inducible por la hipoxia (HIF) ¹⁶. HIF media la defensa en condiciones de hipoxia, estimulando la expresión de genes relacionados con la angiogénesis, metabolismo de la glucosa, proliferación/supervivencia celular; en tanto que Nrf-2 activa la transcripción de genes antioxidantes como glutatión peroxidasa, superóxido dismutasa, etc. ¹⁷.

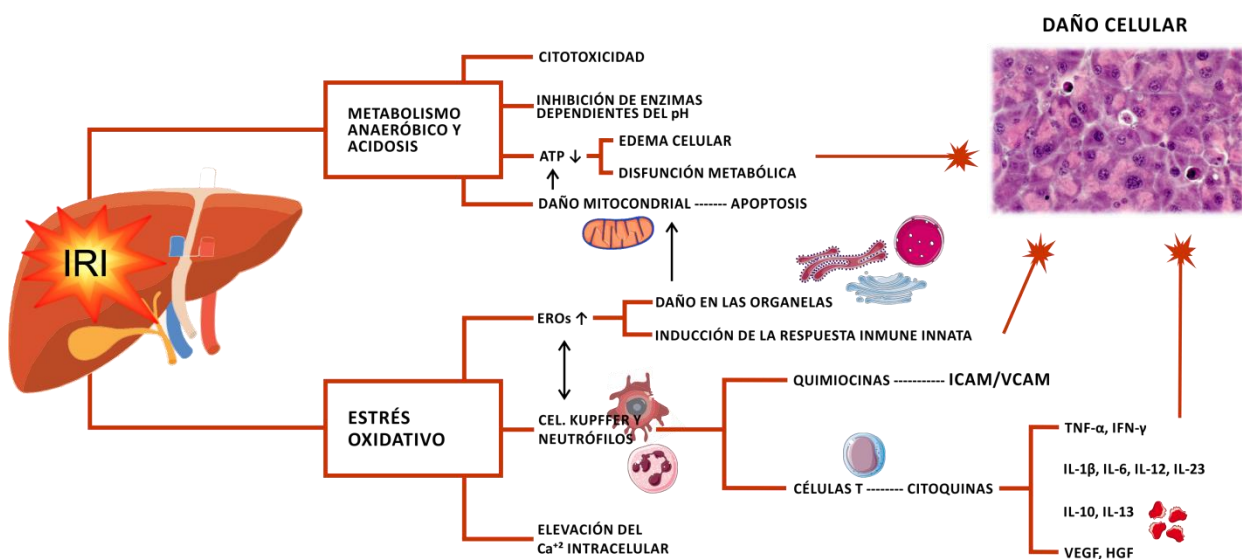


Figura 5. Mecanismos de daño y activación celular en la injuria por I/R. Las vías más importantes por las cuales se produce daño por I/R en el hígado se inician por el estrés oxidativo, el metabolismo anaeróbico y la acidosis, lo que resulta en el daño celular a través de la inducción de la apoptosis, las respuestas inmunes y la regulación de las citoquinas. ATP: adenosina trifosfato; IL: interleuquina; EROs: especies reactivas del O₂; IRI: injuria por isquemia y reperusión; IFN- γ : interferon-gamma; ICAM: moléculas de adhesión intercelulares; VCAM: moléculas de adhesión vasculares; TNF: factor de necrosis tumoral; VEGF: factor de crecimiento endotelial vascular; HGF: factor de crecimiento de hepatocitos. Adaptado de L.Y. Guan y col, 2014.

Escasez de órganos, listas de espera crecientes

En la actualidad, el trasplante es un procedimiento de muy alta aceptación para patologías crónicas y agudas en el hígado. Debido al refinamiento de la técnica y de las terapias inmunosupresoras, las tasas de supervivencia post-trasplante han aumentado significativamente en los últimos años (5 años de funcionamiento del órgano trasplantado e índices de sobrevida del 60-90%) ¹⁸. A raíz de ello, cada vez son más los pacientes que ingresan en la lista de espera por un hígado que salve o mejore su calidad de vida, mientras que, la cantidad de órganos aptos para trasplantar permanece estática, por lo que muchas de estos pacientes fallecen sin poder ser trasplantados. En Argentina actualmente existen 1240 pacientes esperando por un hígado, siendo que anualmente se realizan aproximadamente 400 trasplantes de hígado (Fuente: INCUCAI).

Esta problemática se ha enfrentado desde distintos ángulos ¹⁹:

- Intensificación de los esfuerzos en la identificación de todos los potenciales donantes con muerte cerebral.
- En lo posible, los hígados en mejores condiciones (pacientes jóvenes con muerte cerebral) serán destinados a la técnica de partición, donde dos receptores serán beneficiados.
- Donación en vida, aplicable sobretodo en trasplantes pediátricos.
- Utilización de hígados “*marginales*” o subóptimos: donantes de edad avanzada, hígados esteatósicos y donantes con muerte por arresto cardíaco o *donantes a corazón no batiente*.

Donantes de órganos

Un donante de órganos y tejidos es aquella persona que ha decidido donar sus órganos en vida (donante vivo) o para después de su muerte (donante cadavérico), para ser implantados en un receptor que padece la insuficiencia terminal de algún órgano o tejido ²⁰. Cuando ha ocurrido la muerte bajo criterios neurológicos (muerte encefálica), todos los órganos del cuerpo a excepción del cerebro y del tronco encefálico continúan irrigados porque se mantiene la función de bomba cardíaca. Al estar aún perfundidos se encuentran en condiciones de ser extraídos (procurados) y trasplantados a un paciente que presenta una insuficiencia orgánica terminal (receptor). Por lo tanto, el sujeto, sea hombre o mujer, que por criterios médicos y legales (en Argentina ley 24.193) es un cadáver, puede donar órganos perfundidos y tejidos, constituyéndose en donante de órganos a corazón batiente (DBD, del inglés donation after brain death) ²¹. Los órganos que se utilizan actualmente en Argentina para los trasplantes provienen de este tipo, donantes por cese irreversible de las funciones encefálicas, cuyo corazón continúa latiendo, asistido mecánicamente o no.

En el donante a corazón batiente (o cadavérico), las funciones homeostáticas se van deteriorando en forma progresiva y acelerada, evolucionando indefectiblemente al paro cardíaco en pocas horas si no se toman las medidas necesarias para que esto no ocurra. Por este motivo, la posibilidad del trasplante depende del efectivo tratamiento de los órganos que se han seleccionado para ofrecer a la lista de espera.

Donantes a corazón no batiente (DCD)

Mucho antes de la definición unificada de muerte encefálica, los primeros trasplantes hepáticos se realizaban con órganos de donantes a corazón parado, presentando los pacientes tasas de sobrevida muy pobres ²². A principios de los noventa, en plena vigencia del concepto de muerte cerebral, hubo escasos intentos de trasplantes a partir de hígados procurados post-cese cardíaco, y sus resultados fueron desfavorables. Sin embargo, ante la escasez crítica de donantes para satisfacer la demanda de las listas de espera, las perspectivas comenzaron a reevaluarse y se comenzó a considerar la necesidad de emplear órganos de criterio extendido o marginales, lo que podría aumentar en un 20% el pool de órganos disponibles ²³.

Los órganos marginales son aquellos que provienen de personas añosas, hígados esteatósicos o los comúnmente llamados a corazón no batiente o DCD. Para poder hacer uso de estos hígados, se vuelve indispensable mejorar las técnicas de preservación de los mismos, con el fin de recuperar o acondicionar estos tejidos y hacer su uso seguro en el trasplante, ya que los métodos clásicos de preservación han demostrado no ser tan efectivos para mantener la viabilidad de los órganos procedentes de tales donantes ²⁴.

En la conferencia de Maastricht (Holanda) de 1995, y posteriormente modificada en 2013 (Paris), se llevó a cabo una clasificación de donantes a corazón no batiente (Figura 6) ²⁵:

Categoría	Estado del potencial donante	Situación hospitalaria
I	Muerte en camino	emergencias
II	Resucitación fallida	emergencias
III	En espera del cese cardíaco	Terapia intensiva
IV	Cese cardíaco luego de la muerte encefálica	Terapia intensiva

Figura 6. Clasificación de Maastricht de **donantes a corazón no batiente**. Las categorías I y II son denominadas “no controladas” y las categorías III y IV “controladas” según el poder de control sobre el lapso de isquemia en normotermia. Extraído de D. Monbaliu y col, 2012.

Los DCD controlados suelen ser aquellos pacientes cuya muerte se efectiviza al prescindir de los medios mecánicos que mantienen sus órganos en funcionamiento. En ese caso, la unidad de trasplante puede estar presente en el momento del deceso y así minimizar el tiempo de isquemia caliente. En un reporte de la conferencia nacional de donación a corazón parado realizada en Estados Unidos en 2005 se estableció que el período de isquemia caliente no debe superar los 30 min en hígado y los 60 min en riñón y páncreas ²⁶.

Cada país cuenta con un marco médico-legal propio, por ejemplo en España sólo se utilizan DCD no controlados; mientras que en Bélgica, Holanda y Reino Unido utilizan

DCD controlados; en EEUU se utilizan ambos ¹⁹. En Argentina no se utilizan este tipo de donantes en la actualidad.

Los hígados provenientes de DCD soportan un período de isquemia en normotermia o caliente (en oposición a la isquemia fría durante la preservación en hipotermia), durante el cual no existe ningún tipo de intervención para contrarrestar la injuria por hipoxia. Este insulto previo a la procuración, es la razón por la cual los porcentajes de disfunción primaria de estos órganos superan en un factor de 4 a 5 veces los de órganos de donantes con muerte encefálica (corazón batiente). La formación de coágulos post-mortem que bloquean la vasculatura hepática, y por ende generando inconvenientes en la perfusión y daños en la vía biliar, son las complicaciones más frecuentes asociadas a este tipo de trasplantes ²⁷.

Estrategias para el reacondicionamiento de los órganos

La técnica de preservación utilizada hasta el momento de la implantación tiene un gran impacto en la potencial recuperación de hígados con un período de isquemia caliente subyacente. Actualmente, existen dos métodos de preservación en uso clínico: el almacenamiento en hipotermia (método estático) para la mayoría de los órganos, y la perfusión hipotérmica (método dinámico). El almacenamiento en frío demora la progresión de la injuria a través de un rápido descenso en la temperatura y permite el tratamiento farmacológico del órgano previo a la reoxigenación. La perfusión hipotérmica, en cambio, provee oxígeno y nutrientes en todo momento, facilitando la recuperación del ATP, como así también la intervención y evaluación del órgano antes de ser implantado.

El diseño de soluciones de preservación con el objetivo de acondicionar los órganos y protegerlos de las injurias por I/R constituye un punto crucial para promover la expansión en el criterio de selección de hígados para trasplante.

Muchas de las estrategias abordadas consisten en la administración de metabolitos antioxidantes como el glutatión, alopurinol o α -tocoferol para evitar los daños por especies reactivas de oxígeno. También se ha buscado utilizar drogas anti-factor de necrosis tumoral (TNF- α) que inhiban la acción proinflamatoria desencadenada por esta citoquina y anticuerpos que inhiban la adhesión de los neutrófilos, entre otras. Incluso la terapia génica podría proteger a los órganos, ya que permitiría incrementar la expresión de enzimas involucradas en la defensa antioxidante (superóxido dismutasa, catalasa, glutatión peroxidasa), de proteínas antiapoptóticas como Bcl-2 y citoprotectoras como HO-1; sin embargo este tipo de técnicas conlleva cierto nivel de complejidad a nivel de seguridad biológica.

SOLUCIONES DE PRESERVACIÓN

“La elección de la solución de preservación y la ciencia que sustenta su desarrollo son fundamentales para la preservación de órganos, ya sea que se use preservación dinámica o estática” ²⁸.

La composición de la solución de preservación facilita el control de los cambios bioquímicos que se producen durante el período de almacenamiento en frío y durante

el período de isquemia, lo que es fundamental para mantener la viabilidad de los órganos ²⁹. Por lo tanto, las características fisicoquímicas de la solución son un factor determinante en la preservación del órgano, y si bien todavía no existe una solución ideal, una variedad de soluciones de preservación han sido formuladas, y todas ellas comparten una serie de componentes para: 1) minimizar el edema tisular y celular, (2) mantener un balance iónico apropiado, (3) prevenir la acidosis, (4) remover o prevenir la formación de radicales libres, y (5) proveer sustratos para la regeneración de compuestos de alta energía que promuevan la recuperación durante la reperfusión normotérmica ^{11,30}.

Durante el período de hipotermia, las actividades metabólicas se ven reducidas pero no eliminadas del todo; la mayoría de las enzimas animales disminuyen su actividad entre 1,5 y 2 veces cada 10°C de descenso en la temperatura ³⁰. El hígado requerirá inevitablemente sustratos durante la preservación, por lo tanto, la solución a utilizar debe contener los metabolitos necesarios ³¹. Además, la hipotermia en sí genera una injuria celular en el hígado y es necesario, entonces, que la solución empleada contenga también los componentes que protejan al órgano de este daño celular inducido por el frío ²⁴. Uno de los principales problemas es la formación de edemas en espacio intersticial debido a que las condiciones de preservación no mantienen la presión oncótica fisiológica. Dicha presión, *in vivo*, se controla a través de los componentes de la sangre, pero esto se pierde cuando se emplean soluciones acelulares ³². En un principio, en los sistemas de perfusión se usaba sangre diluida, pero con ésta se producían trombosis debida al aumento de la viscosidad al disminuir la temperatura, lo que resultaba en un aumento de la presión de perfusión. El uso de perfusatos sin el agregado de coloides tampoco era adecuado, a menos que se trabajase con presiones de perfusión bajas, pero esto generaba la perfusión incompleta del órgano. Luego se desarrollaron perfusatos a base de plasma que presentaron ciertas mejoras. Al mismo tiempo se diseñaron soluciones suplementadas con agentes oncóticos como el dextrano, o coloides basados en proteínas sintéticas como polipéptidos de gelatina. El gran paso en el desarrollo de soluciones de perfusión para sistemas de perfusión provino del trabajo de Southard y Belzer en 1980, quienes desarrollaron un perfusato completamente sintético basado en almidón hidroxietilado (HES) ^{32,33}. Todavía no se sabe cuál es el coloide más efectivo para el hígado, pero sí que se necesita alcanzar un balance entre la viscosidad del perfusato, el soporte oncótico y la carga del coloide.

Algunas soluciones de preservación han sido ampliamente utilizadas tanto en el trasplante experimental como en la clínica. Cada una de ellas tiene características positivas y negativas, y proporcionan un tiempo de almacenamiento similar ^{34,35}. Hasta ahora no hay consenso sobre cuál es la solución idónea para prolongar el tiempo de preservación del órgano y maximizar el rendimiento de los trasplantes al mejorar la calidad y la función del órgano.

A continuación se describen las soluciones más ampliamente utilizadas:

Solución de la Universidad de Wisconsin (UW) o ViaSpan®

En 1986, Belzer y Southard en la Universidad de Wisconsin lograron desarrollar y producir una solución marcadamente efectiva para la preservación del hígado,

páncreas y riñón, la que denominaron "UW". La utilización de la misma produjo importantes mejoras en el trasplante hepático, brindando una mayor protección a las células endoteliales, particularmente susceptibles a la isquemia fría. Además se logró extender el tiempo de preservación hasta 18 h (en humanos) y se mejoró la viabilidad y funcionalidad del órgano preservado y reperfundido ³⁶. Esta solución contiene agentes como el lactobionato y la rafinosa que previenen el hinchamiento celular, mientras que, la presencia del almidón hidroxietilado (HES), un coloide estable no tóxico, previene la expansión del espacio extracelular o intersticial. Otros componentes únicos de esta solución son la adenosina, que estimula la síntesis de ATP, y el glutatión que confiere protección ante radicales libres del oxígeno al igual que el allopurinol, que también inhibe a la xantina oxidasa. Además se ha informado que el lactobionato y el glutatión poseen efectos inhibidores sobre la acción de metaloproteasas involucradas en la lesión tisular ³⁷. Por otro lado, la omisión de la glucosa en su composición evita el aumento de la acidez intracelular.

Solución Histidina-Triptófano-Cetoglutarato (HTK) o Custodiol®

Solución de preservación desarrollada por Bretschneider ³⁸, originalmente diseñada para ser utilizada en cirugías cardíacas, pero en la actualidad compete con la solución UW en la preservación hepática y renal, experimental y clínica ³⁹. La Solución Custodiol® se considera una solución intracelular, es decir, que contiene bajas concentraciones de los electrolitos Na^+ , Ca^{2+} , K^+ y Mg^{2+} . La misma cuenta con el sistema buffer histidina/clorhidrato de histidina que brinda una osmolaridad normal y mejora la capacidad amortiguadora de la solución durante la acidosis inducida por la isquemia; además, la histidina también es un eficaz protector de membrana y mejora la restitución del ATP. El aminoácido triptófano protege membranas celulares, mientras que el α -cetoglutarato ayuda a estabilizar las membranas celulares y es un sustrato para el metabolismo anaeróbico. El manitol mantiene una osmolalidad fisiológica o ligeramente aumentada y, de esta forma, contrarresta la presión osmótica coloidal de las proteínas intracelulares para reducir el edema celular. El manitol también actúa como neutralizador de radicales libres. A excepción del manitol, todos los componentes se encuentran normalmente en el cuerpo. La baja concentración de electrolitos de esta solución implica que no se requiere de un lavado previo del sistema vascular del órgano a trasplantar. Además, su baja viscosidad (similar a la del agua) permite un lavado de mayor penetración mejorando la eficiencia del enfriamiento inicial, e incluso, la misma podría ser adecuada para ser utilizada durante perfusiones hipotérmicas. Debido a que el costo de esta solución es menor que el de sus principales competidoras, la misma ha ganado bastante popularidad en los últimos 20 años.

Solución EuroCollins®

La primera solución desarrollada para la preservación de órganos fue la solución de Collins en los años 70. Esta solución que había sido diseñada específicamente para riñón, luego se modificó en Europa (solución EuroCollins) para su aplicación en la preservación de otros órganos, entre ellos el hígado. La Solución EuroCollins contenía

una alta concentración de glucosa y permitía preservar riñones entre 24 y 30 h. Sin embargo, solo permitía la preservación de hígados de 4 a 8 h.

Otras soluciones

En los últimos años se introdujo en la clínica la solución de **Celsior®**, utilizada inicialmente en trasplantes de corazón y pulmón, y luego en riñón, hígado y páncreas. Al igual que HTK, Celsior también podría ser adecuada para ser utilizada durante perfusiones hipotérmicas debido a su baja viscosidad y su bajo contenido de K^+ ; además contiene manitol, histidina y glutatión reducido.

La solución del Institut-Georges-Lopez-1 (**IGL-1®**) se basa en gran medida en la solución UW, sin embargo, tiene un equilibrio iónico cercano a las relaciones extracelulares de Na^+/K^+ y un coloide menos viscoso (polietilenglicol).

La solución **Ti-Protec** se basa en la fórmula de la solución HTK, pero a diferencia de esta posee un mayor contenido de iones fraccionados, α -cetoglutarato y aspartato como intermediarios metabólicos, y quelantes de hierro para prevenir el estrés oxidativo catalizado por el hierro^{29,40}.

Durante la última década no ha habido un gran cambio en la composición de las soluciones de preservación. Con los avances obtenidos en el campo de la preservación por perfusión y el rescate de órganos marginales, existe una mayor necesidad de desarrollar nuevas alternativas.

Solución BGP-HMP

Durante muchos años la solución UW se mantuvo como solución de referencia para la preservación de órganos. Posteriormente fueron apareciendo en el mercado otras alternativas y la UW se fue discontinuando, por lo que cada vez se hizo más complicado obtenerla y los precios aumentaron. Estos hechos hicieron visible la necesidad de continuar investigando en el campo y lograr obtener una solución que no solamente mejore los resultados de la preservación, sino también que pueda aumentar el tiempo de la misma sin comprometer la viabilidad de los órganos y además sea más económica. Si bien en los últimos años surgieron soluciones como Celsior® e IGL-1®, y anteriormente lo había hecho Custodiol®, aún no hay un completo acuerdo sobre cuál es la que garantiza los mejores resultados a corto y largo plazo⁴¹⁻⁴³.

En nuestro laboratorio nos propusimos obtener una solución de preservación que fuera idónea para ser empleada por la técnica de preservación dinámica con máquinas de perfusión, como así también por SCS para todos los órganos abdominales. Desarrollamos una solución capaz de ser preparada en cualquier laboratorio o farmacia de hospital y la denominamos BGP-HMP.

La composición exacta de la misma se detalla en la tabla 1 en el apartado de Materiales y Métodos. Los componentes de esta solución poseen las siguientes características:

- **Anión gluconato** (provisto como gluconato de sodio y gluconato de potasio). Debido a su tamaño y carga es un agente impermeable a la membrana plasmática, y en consecuencia evita el edema celular que se genera por el ingreso de agua asociado al

ingreso de Cl^- a la célula durante la hipotermia. El gluconato se adiciona con el fin de remplazar al Cl^- impidiendo el desbalance iónico.

- **PEG.** Previene el edema celular, la expansión del espacio intersticial, y preserva la estructura del citoesqueleto ⁴⁴. Se ha observado también que posee un efecto protector sobre la membrana plasmática de una variedad de células contra diferentes tipos de injurias, evitando la peroxidación lipídica generada por las especies reactivas del oxígeno ⁴⁵.
- **BES (ácido N,N-bis (2-hidroxietil)-2-aminoetanosuofónico).** Es un sistema buffer basado en el ácido sulfónico, con pKa de 7,09 a 25°C. Existen pocos estudios realizados con BES como buffer en soluciones de preservación hipotérmica. El mismo resultó ser el agente buffer más efectivo en la preservación de corazón ⁴⁶ y es una alternativa interesante a estudiar. El objetivo de incluir al mismo es regular el pH de la solución previniendo la acidosis intracelular.
- **KH_2PO_4 .** También se adiciona con el fin de contribuir a la regulación del pH.
- **MgSO_4 .** Es un estabilizador de membrana.
- **Glicina.** Mejora el funcionamiento mitocondrial (respiración y síntesis de ATP) ⁴⁷ y mantiene la integridad de la membrana ⁴⁸. Existe evidencia la cual indica que la glicina es un inhibidor de las calpainas, una familia de proteasas dependientes de Ca^{2+} que se relacionan con el procesamiento de numerosas enzimas y proteínas del citoesqueleto, además están involucradas en la muerte celular ⁴⁹.
- **Sucrosa.** Actúa como soporte osmótico adicional.
- **Penicilina G y estreptomicina.** Las concentraciones de estos antibióticos se ajustaron para inhibir el crecimiento bacteriano sin afectar la viabilidad de los hepatocitos.
- **Glutación.** Es un factor importante de protección contra las especies reactivas del oxígeno, por lo tanto, es incluido para evitar su depleción durante la isquemia fría.
- **Adenosina.** Es un sustrato agregado para generar ATP durante la reperfusión.

TÉCNICAS DE PRESERVACIÓN DE ÓRGANOS PARA TRASPLANTE

La interrupción de la circulación sanguínea y el subsecuente transporte del órgano hacia el receptor inician una cascada de eventos que conducen a la muerte del mismo. Para evitar este período de isquemia, el órgano debe ser correctamente preservado para, de esta manera, minimizar la injuria producida por la isquemia.

Los métodos clínicos que se utilizan para preservar órganos, en particular riñones, fueron desarrollados a finales de la década del 60 por Belzer ⁵⁰, quien utilizó la técnica dinámica con la máquina de perfusión hipotérmica, y por Collins ⁵¹, quien realizó preservaciones estáticas en riñones previamente lavados con solución de preservación

fría. Dichos métodos de preservación se volvieron aplicables, de la misma forma que en riñones, en los demás órganos incluyendo al hígado.

Máquinas de perfusión

A diferencia de la preservación por SCS, los sistemas de perfusión proveen al órgano de una circulación continua, distribuyen los substratos metabólicos, remueven los productos de desecho y mejoran la integridad microvascular durante la preservación⁵².

Se conocen diversos sistemas de perfusión que pueden diferenciarse por varios aspectos, por ejemplo, de acuerdo a la temperatura a la cual es perfundido el órgano (ver página 23). La perfusión en normotermia intenta replicar el ambiente fisiológico normal de un órgano, por lo cual es el mejor método para mantenerlo funcional *ex-vivo* luego de haberlo extraído del donante^{53,54}. Sin embargo, la perfusión normotérmica presenta riesgos de contaminación bacteriana, no tiene las ventajas de la perfusión hipotérmica en cuanto a la disminución del metabolismo, el menor requerimiento de nutrientes esenciales y del suministro de O₂, y es más compleja que esta última.

La técnica de perfusión hipotérmica se realiza mediante la máquina de perfusión hipotérmica; dicha técnica fue utilizada durante los comienzos de los programas de trasplante hepático y renal, pero se abandonó posteriormente tras el desarrollo de las soluciones de preservación estática, y principalmente por los costos y la logística necesaria. Actualmente y a la luz de las nuevas tecnologías disponibles (mejores soluciones de preservación y mejores equipos de perfusión) se está reevaluando su utilización para el rescate de órganos marginales para trasplante²¹.

Mediante la perfusión hipotérmica el hígado del donante es perfundido de manera continua con solución de preservación a 0-4°C. Esta acción proporciona un suministro continuo de nutrientes a las células hepáticas y elimina de manera continua los productos de desecho, favoreciendo de esta manera la preservación; se dice que el órgano es preservado en un “ambiente mejor”²⁴. En el caso de riñones provenientes de donantes cadavéricos, esta metodología ha permitido recuperar un alto porcentaje de riñones marginales, obteniéndose una reducción en el rechazo y mal función post trasplante⁵⁵. Para hígados la situación es diferente, ya que existen muchos interrogantes a responder. Por ejemplo, cuál debería ser la concentración de oxígeno en la solución de preservación/perfusión durante la perfusión, en vista de la perfusión y sus efectos sobre la viabilidad celular²³. Además es importante considerar el modo de perfusión (continuo o discontinuo) y el tipo de flujo (pulsátil o no)⁵.

Para riñones, la HMP es ampliamente utilizada, inclusive con donantes DCD y mejores resultados que por SCS. Para hígados la HMP está en etapa preclínica.

A continuación se detallan las ventajas y desventajas asociadas a la utilización de sistemas de perfusión para la preservación de órganos (Figura 7):

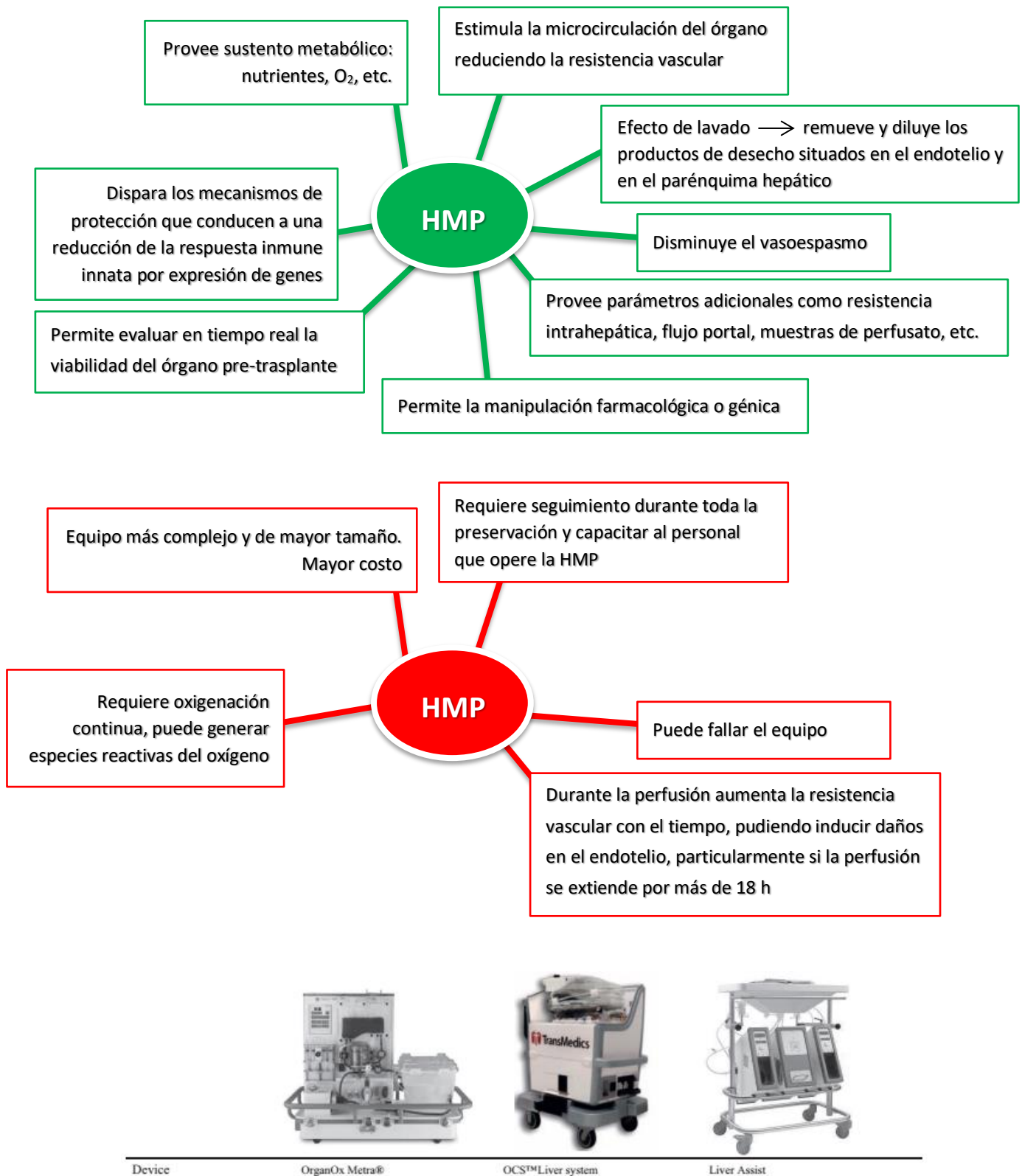


Figura 7. Arriba: ventajas y desventajas de los sistemas de perfusión hipotérmica. **Abajo:** principales sistemas de perfusión de hígados con los que se están llevando a cabo los trials clínicos para la técnica. Extraído de R.W. Laing y col, 2017.

Antecedentes de los sistemas de perfusión

La primera referencia bibliográfica encontrada en la literatura data de 1812 cuando Cesar-Le Gallois plantea la sustitución del corazón por un sistema de bombeo que, de forma continua proporcionase sangre arterial o un medio líquido alternativo adecuado para mantener funcional de forma indefinida una parte aislada del organismo. Este suceso regiría la mayoría de los avances posteriores. En la segunda mitad del siglo XIX se llevaron a cabo experimentos sobre sistemas de oxigenación sanguínea para perfusión renal aislada. Finalmente Jacobi, diseñó en 1890 un aparato para perfusión renal que oxigenaba sangre mediante infusión directa de aire.

Durante la primera mitad del siglo XX, los aspectos dinámicos y bioquímicos de la perfusión de órganos aislados despertaron gran interés. Los diseños experimentales para perfusión cardíaca supusieron una fuente importante de investigación e información. En 1912 sobresalieron los trabajos de Knowlton y Starling, éste último realizó una perfusión renal aislada en donde estudió la excreción de orina. Posteriormente se utilizó este modelo observando que la presión arterial de perfusión, el flujo sanguíneo y la temperatura eran controlables, pudiendo estudiarse el órgano bajo condiciones comparables a las del animal vivo ⁵⁶.

Un hallazgo importante para el desarrollo de posteriores dispositivos de perfusión fue el obtenido por Richards y Plant, quienes detectaron variaciones en la cantidad y composición de la orina producida al modificar la presión sanguínea renal durante la perfusión. Este dato fue particularmente importante, ya que permitió pensar que, no sólo los factores bioquímicos, sino también los dinámicos influyen en el riñón perfundido desde el punto de vista funcional. Los estudios se enfocaban en la perfusión de órganos a la temperatura normal del cuerpo y existía un menor interés en la perfusión a temperaturas sub-fisiológicas. Sin embargo, la llegada de los trasplantes clínicos como una realidad terapéutica en la década del 60, exigió una re-evaluación de la perfusión de los órganos a preservar. Al mismo tiempo se conocieron los beneficios de disminuir la temperatura, respecto a la demanda de O₂ en la perfusión de riñón.

Uno de los pioneros en el trabajo con sistemas de perfusión hipotérmica fue Belzer ³². En sus estudios de 1967 describió la posibilidad de realizar perfusión de riñones aislados de manera experimental durante al menos 24 h, señalando que el daño celular que se producía como consecuencia del período de preservación era pequeño y rápidamente reversible ⁵⁶. Belzer desarrolló uno de los primeros sistemas de perfusión hipotérmica confiable y transportable (Figura 8). Posteriormente se definieron dos campos de estudio en la perfusión renal, la preservación por simple hipotermia (SCS) y la perfusión mecánica del órgano utilizando bombas. Según Rodríguez-Martínez y col ⁵⁶, los experimentos efectuados por Cerra, junto con la introducción de soluciones para la preservación mediante la inmersión hipotérmica simple, y el alto costo de los sistemas de perfusión existentes, hicieron que ganara gran interés la preservación por SCS frente a la perfusión mecánica con bomba. A pesar de esto, se siguieron estudiando y comparando ambos métodos de preservación. El desarrollo de los sistemas de perfusión para otros órganos se mantuvo activo pero los principales avances en la perfusión hipotérmica se lograron trabajando con riñón ³². Debido a su potencial mejor aptitud para utilizar el pool de donantes y prolongar el tiempo de almacenamiento, existe un interés cada vez mayor en la perfusión hipotérmica del hígado.



Figura 8. Dr. Folkert O. Belzer con su **primera máquina de perfusión hipotérmica** transportable en la década del 60.

Clasificación de las técnicas de perfusión de órganos

Con el correr de los años, al hablar de perfusión de órganos se han citado diferentes estrategias y temperaturas de perfusión sin consenso entre autores. Términos tales como hipotérmica, subnormotérmica o normotérmica se utilizaron con frecuencia para referir las temperaturas de perfusión, y la ausencia de un criterio estandarizado para describir los detalles técnicos condujo a una gran heterogeneidad entre los estudios. Actualmente se ha propuesto una clasificación de las técnicas de perfusión que se basa en la temperatura y que facilita la comparación de diferentes estudios, la realización de metanálisis y la homogeneización de criterios ^{28,57}:

- *Hypothermic machine perfusion (HMP) (0°C-12°C):*

La perfusión a este rango de temperatura reduce principalmente el metabolismo de los tejidos, al mismo tiempo que, a través de la solución de preservación, proporciona los sustratos metabólicos necesarios para la síntesis de ATP y la eliminación de los desechos metabólicos mediante el lavado del parénquima y del endotelio ⁵⁸. El punto de corte propuesto para HMP a 12°C está respaldado por la observación de numerosas reacciones enzimáticas dependientes de la energía que se llevan a cabo en las mitocondrias de las células hepáticas y que muestran cambios significativos en la tasa de actividad a esta temperatura ⁵⁷.

En consecuencia, algunos de los beneficios de la HMP son: minimiza el daño inevitable ocasionado por la isquemia fría, mejora la viabilidad de los injertos y evita la producción de lesiones en las vías biliares ^{59,60}. Cuando este tipo de perfusión se complementa con el suministro de oxígeno, también brinda la oportunidad de restablecer la actividad redox mitocondrial y el estado energético celular ⁶¹. Además, la HMP reduce la respuesta inflamatoria previniendo la activación de las células Kupffer y disminuyendo la actividad de los neutrófilos y de las plaquetas durante la reperfusión ⁶². Por otro lado, la HMP se considera una técnica segura porque, en el caso de una falla de la máquina, el injerto simplemente vuelve a las condiciones de almacenamiento en frío estándar por SCS.

La primera experiencia en humanos utilizando ésta técnica fue reportada por *Guarrera y col* en 2010. La misma se llevó a cabo perfundiendo hígados de manera dual y sin el suministro de oxígeno auxiliar (vena porta y arteria hepática); se utilizaron 20 hígados provenientes de donantes clásicos a corazón batiente (DBD). Luego de 12 meses post-trasplante, la tasa de supervivencia fue del 90%, la disfunción temprana

del aloinjerto ocurrió solo en el 5% de los pacientes, mientras que la incidencia de estenosis biliar fue también del 5% ⁶³.

Van Rijn y col ⁶⁴, en cambio, probaron una HMP con perfusión dual y oxigenada sobre hígados provenientes de pacientes a corazón no batiente (DCD). Los resultados obtenidos sobre la preservación de las vías biliares también fueron alentadores, ninguno de los hígados preservados requirió ser retrasplantado a causa de estenosis biliar no anastomótica, a diferencia del grupo control donde 5 de los 20 hígados debieron ser retrasplantados. En el ensayo clínico de HMP más grande realizado hasta la fecha, 50 receptores de hígados DCD lograron resultados superiores en comparación con los injertos de DCD no perfundidos y los injertos de DBD perfundidos ⁶⁵.

- ***Midthermic machine perfusion (MMP) (13°C-24°C):***

En vistas de que desde 12°C a 33°C es un rango de temperatura muy grande y muestra una gran diferencia en la tasa de metabolismo, Karangwa y col ⁵⁷ consideraron apropiado subdividir este intervalo y propusieron el término de máquina de perfusión a temperaturas medias.

Con los términos máquina de perfusión a temperaturas medias (MMP) y máquina de perfusión en subnormotermia (SNMP) se buscó lograr un equilibrio entre los efectos perjudiciales de la isquemia fría y los altos requerimientos metabólicos de la normotermia ⁶⁶. La aplicación de la máquina de perfusión a temperaturas medias resultó en una menor resistencia intravascular, mejores parámetros hemodinámicos y una función mitocondrial más fuerte; estos efectos coincidieron con una mayor carga energética y una mayor producción de bilis ⁶⁷.

Bruinsma y col estudiaron el impacto de perfundir durante 3 horas a temperatura media (21°C) 7 hígados de descarte. Los injertos se calentaron gradualmente hasta alcanzar la temperatura final en 1 hora. Los resultados mostraron no solo que no había lesión hepática, sino que también la funcionalidad hepática se encontraba mejorada ⁶⁸.

- ***Subnormothermic machine perfusion (SNMP) (25°C-34°C):***

A temperaturas comprendidas entre 16-25°C es posible perfundir el injerto sin la presencia de glóbulos rojos, lo que simplifica el procedimiento y reduce los costos. Esto es factible porque a temperaturas subnormotérmicas disminuye la actividad de la cadena respiratoria en las mitocondrias y por ende la demanda celular de energía y oxígeno ⁶⁹.

En experimentos donde se utilizaron hígados de cerdo esteatósicos y provenientes de DCD, la perfusión subnormotérmica de los mismos redujo la lesión hepática y biliar ⁷⁰. Además de las mejoras en el tracto biliar, en el período post-trasplante los niveles séricos más bajos de fosfatasa alcalina fueron medidos en el grupo tratado con SNMP, en comparación con el grupo control. Las mejoras en los protocolos de preservación de órganos marginales tienen el potencial de aumentar la cantidad de órganos disponibles para trasplante y de mejorar la función del injerto después del trasplante.

El recalentamiento o reperfusión controlada y con suministro de oxígeno (COR) es la aplicación más reciente que se le ha dado a la máquina de perfusión. La perfusión comienza a temperaturas hipotérmicas y aumenta gradualmente hasta la subnormotermia ⁵², mejorando la restitución de la homeostasis celular y mitigando la lesión por reperfusión ⁶².

Recientemente se ha aplicado COR clínicamente; se trasplantaron de manera exitosa seis injertos provenientes de DBD y aceptados bajo los criterios de "asignación de rescate" ⁷¹. El grupo COR demostró un pico de AST más bajo al compararlo con los controles, y el 100% de los pacientes e injertos sobrevivieron luego de los 6 meses post-trasplante.

Por otra parte, se espera que la perfusión subnormotérmica *ex vivo* tenga un papel cooperativo con otras técnicas de preservación ⁷². Un ejemplo de esto es la técnica de sobreenfriamiento o supercooling, que fue utilizada para preservar hígados de rata hasta 96 h ⁷³. El supercooling se combinó con la perfusión subnormotérmica para la carga de crioprotectores en el hígado, así como para el recalentamiento posterior al enfriamiento. Antes del supercooling, los investigadores utilizaron la perfusión subnormotérmica para cargar en los hígados de rata aislados un derivado de glucosa no metabolizable (3-O-metil-d-glucosa, 3-OMG). Los hígados fueron enfriados hasta los -6°C y se evitó la formación de hielo intracelular y, al final del supercooling, se realizaron 3 h de perfusión subnormotérmica para lograr un período de recuperación adecuado para el hígado antes del trasplante ortotópico. La supervivencia del receptor a tres meses post-trasplante en el grupo que recibió hígados enfriados durante 72 horas a -6°C fue del 100%.

- ***Normothermic machine perfusion (NMP) (35°C-38°C):***

El término normotermia generalmente se refiere a la temperatura corporal fisiológica de las especies utilizadas en el estudio, es decir, 37°C para estudios en humanos y roedores, y 38°C en estudios con modelos porcinos. La idea que subyace a la técnica es replicar el metabolismo normal del hígado fuera del cuerpo, proporcionando oxígeno y los sustratos esenciales en un ambiente mantenido a una temperatura normal (37°C), evitando por completo la isquemia y la hipotermia ⁶⁷. Una de las principales ventajas que presenta la perfusión normotérmica es la oportunidad de evaluar la viabilidad del órgano antes de su trasplante ⁶², mediante la medición de marcadores del metabolismo hepático (es decir, la producción de bilis y la liberación de enzimas hepáticas). La dificultad de la técnica radica en proporcionar suficiente oxígeno y otros sustratos necesarios para prevenir el deterioro posterior del injerto y la contaminación bacteriana, que es más probable que ocurra en ambientes cálidos ⁶⁶. Por lo general, se requieren perfusatos basados en concentrados de glóbulos rojos, plasma, nutrientes, cofactores e insulina, antibióticos, electrolitos y tampones, lo que hace que la perfusión mecánica normotérmica sea un procedimiento complejo y costoso ⁶⁸.

La tecnología de perfusión normotérmica se desarrolló inicialmente para mitigar los efectos negativos producidos por la preservación por SCS, pero los beneficios adicionales han permitido su uso para fines más amplios ⁵⁴. Por ejemplo, con el agregado de un "cóctel de desengrase" en la solución de perfusión se busca aumentar el efecto protector de la perfusión al estimular el metabolismo de los lípidos. La adición de este cóctel y la perfusión normotérmica durante 3 horas redujo el contenido de lípidos intracelulares de hígados de rata esteatósicos en un 50% ⁷⁴. Otro beneficio adicional de la perfusión normotérmica es la capacidad de extender los tiempos de preservación del órgano. En la primera serie clínica, Ravikumar y col ⁷⁵ pudieron preservar hígados durante 20 h sin comprometer el resultado en el receptor. Por otro lado, Liu y col ⁷⁶ informaron un caso que describe la actividad metabólica de

un hígado humano desechado y perfundido durante 86 h. Este es un hallazgo importante, ya que la preservación a largo plazo podría brindar una oportunidad para la regeneración de tejidos y para el reacondicionamiento de órganos mediante intervenciones farmacológicas, inmunológicas y genéticas. En ese caso, la producción de bilis y la metabolización de lactato se conservaron hasta el final de las 86 h. La histología del parénquima mostró hepatocitos completamente sanos. De todas formas hay que citar que el trabajo tiene la limitación de que los hígados no fueron trasplantados.

Nasralla y col describieron el primer ensayo clínico aleatorizado multicéntrico en el que se comparó la perfusión normotérmica con la SCS estática, 170 hígados fueron perfundidos en normotermia y 164 preservados por SCS. Luego de 1 año post-trasplante hubo una reducción significativa en la lesión del injerto a pesar de presentar una tasa de rechazo de los órganos de un 50% y un tiempo de preservación medio 54% más largo. Al utilizar la perfusión normotérmica no se obtuvieron ventajas significativas en términos de ninguna medida importante, como por ejemplo mejoras en la supervivencia del injerto o del paciente, o la frecuencia de complicaciones biliares ⁷⁷. Por otro lado, Mergental y col informaron la realización de trasplantes de hígado luego someterlos a un período de perfusión normotérmica para evaluar la viabilidad de hígados previamente rechazados. Utilizaron estos hígados después de un período variable de SCS e informaron resultados alentadores con una estancia hospitalaria promedio de 10 días y supervivencia del injerto en todos los receptores ⁷⁸.

Es probable que en el futuro próximo, el concepto de perfusión normotérmica como método de preservación sea cambiado al de método de tratamiento y reparación de órganos ⁷⁹.

Características de la dinámica de la perfusión

Al perfundir el hígado, debe tenerse en cuenta un parámetro muy importante, el efecto de la temperatura. Cuando se disminuye la temperatura desde 37 a 4°C se produce la constricción de la vasculatura hepática y el aumento en la resistencia al flujo de perfusión.

Las presiones de perfusión reportadas en la literatura para los flujos venosos (0,14 – 0,50 mL/min.g hígado) y arterial (0,10 – 1,20 mL/min.g hígado) varía entre 3 y 18 mmHg y entre 20 y 80 mmHg, respectivamente ⁵³. La presión de perfusión debe ser cuidadosamente controlada ya que, una presión muy baja no perfundiría completamente al hígado y una presión muy elevada provocaría un daño irreversible en el mismo. Por lo tanto, la presión de perfusión debe permitir la perfusión completa del órgano y generar el mínimo daño del endotelio. Algunos autores aseguran que se alcanza una perfusión hepática efectiva a 4°C, trabajando aproximadamente al 50% de la presión portal normotérmica. En otros trabajos se obtuvieron mejores resultados empleando una presión de perfusión igual al 25% de la circulación normal del hígado a 37°C ⁸⁰. Al trabajar con ratas, el hígado se suele perfundir sólo a través de la vena porta, mientras que en animales grandes como el cerdo este órgano se perfunde a través de la vena porta y también de la arteria hepática ³¹. La carencia del suministro arterial, en el caso de las ratas, condiciona los resultados experimentales y dificulta la extrapolación de los resultados.

Rol del O₂ en la preservación hipotérmica

Como se mencionó anteriormente, la hipotermia disminuye la velocidad del metabolismo celular. Fujita y sus colaboradores ⁸¹ determinaron que la cantidad de O₂ que se consume a bajas temperaturas, es función logarítmica de las mismas:

$$VO_2 = 0,21 \cdot 10^{0,029 \cdot T} (\mu\text{molO}_2 \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{g hígado}^{-1})$$

Ec. 1

Como la relación es logarítmica, el consumo disminuye a medida que la temperatura también lo hace, pero no llega a cero (el metabolismo requiere 0,27 $\mu\text{mol O}_2/\text{min. g hígado}$ a 4°C). Esto implica que se requiere un cierto suministro de O₂ durante la perfusión hipotérmica del hígado ⁸². Sin embargo, la oxigenación de la solución de preservación puede considerarse como un arma de doble filo; el O₂ es necesario para reabastecer energéticamente al sistema, pero podría ocasionar un aumento de EROs que generaría injurias a nivel celular ²⁴. Existen evidencias experimentales que indican que la preservación aeróbica de los hígados provenientes de donantes marginales es superior, respecto de la preservación por SCS ^{59,83}. El suministro continuo de O₂ permite restaurar la integridad estructural y la homeostasis energética durante la preservación ⁵⁵. Vekemans y sus colaboradores compararon hígados perfundidos en un sistema de perfusión hipotérmica a cuya solución de perfusión se le suministró O₂, con hígados que fueron perfundidos en iguales condiciones sin O₂. Los hepatocitos correspondientes al grupo al que no se le suministró O₂ presentaron vacuolas. La intensidad de la “vacuolación” refleja el grado del daño producido por la isquemia. Algunos autores hacen referencia a estas vacuolas como “postmortem” o “vacuolas anóxicas”. El hecho de que estas vacuolas sean el reflejo de un insulto anóxico queda comprobado al observar que el suministro de O₂ a la solución de perfusión previene este fenómeno, generando una óptima preservación ⁸⁴. Aunque existe un gran interés por el rol del O₂ en los sistemas de perfusión, los requerimientos del mismo durante la perfusión de hígados, no se conocen en profundidad.

Viscosidad y presión coloidosmótica (oncótica)

La viscosidad es una medida de la resistencia del flujo debido a la fricción interna de un fluido. Debido a esta, es necesario aplicar una fuerza para que una capa de fluido se mueva en relación con otra capa. Cuando la resistencia del flujo interno es independiente de la fuerza externa, como es el caso del agua, el fluido se denomina fluido newtoniano. En cambio, cuando el fluido cambia su viscosidad al exponerse a diferentes esfuerzos de cizallamiento, se denominan fluidos no-newtonianos y las viscosidades de tales fluidos se denominan viscosidades aparentes.

En el hígado, la resistencia vascular será directamente proporcional con la viscosidad del fluido de perfusión, en nuestro caso la solución de preservación. En los operativos donde se utiliza preservación estática, se demostró que la viscosidad de la solución de lavado inicial puede jugar un papel importante sobre el resultado de la preservación de órganos que provienen de donantes a corazón no batiente ⁸⁵. Además, la concentración del agente oncótico contenido en la solución de preservación afecta

fuertemente a su viscosidad. Por ejemplo, el almidón hidroxietilado (HES) presente en la solución UW afecta el lavado de los órganos debido a que estimula la agregación de glóbulos rojos ⁸⁶. Los hígados preservados con soluciones de baja viscosidad mostraron una menor resistencia vascular que los que se lavaron con la solución UW en frío y mejoraron la viabilidad del órgano.

Por otro lado, los efectos de la temperatura sobre la viscosidad del fluido en los procedimientos de preservación empleando técnicas de perfusión no se investigaron rigurosamente. Consideramos que es importante llevar a cabo estudios que, no solamente comprendan el efecto de la temperatura, sino también el agregado de agentes coloides sobre la viscosidad de la solución y cómo esto afecta el resultado del órgano después de la preservación.

Starling: *“en los vasos sanguíneos circulan proteínas que no pueden atravesar la membrana endotelial, estas proteínas retienen líquido en el interior del vaso. Los coloides intravasculares promueven la absorción desde el espacio intersticial hacia la microvasculatura”* ⁸⁷.

La **presión coloidosmótica (COP)** o presión oncótica del plasma es una forma de presión osmótica producida por las proteínas plasmáticas a nivel de las membranas capilares. Representa la fuerza contraria a la presión de filtración en la circulación sanguínea y, por lo tanto, es parcialmente responsable de la distribución del agua entre la vasculatura y el espacio intersticial ⁸⁸. Su valor fisiológico es de aproximadamente 25 mmHg y es determinado principalmente por la concentración de albúmina en la sangre.

Al aplicar este concepto en la preservación de órganos, particularmente en experimentos de perfusión a largo plazo, las sustancias oncóticamente activas son esenciales para contrarrestar el edema intersticial, que se produce inevitablemente cuando estas sustancias no se agregan a la solución de perfusión (Figura 9).

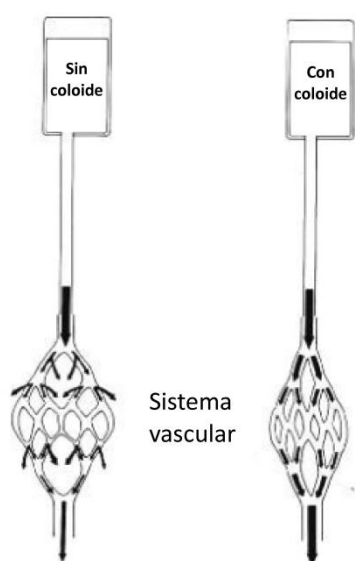


Figura 9. En ausencia de un agente coloide, la presión del flujo puede causar una rápida expansión del espacio intersticial y el colapso de la red vascular conduciendo a una perfusión incompleta. Con el agregado de un agente coloide, en cambio, la red vascular permanecerá con la turgencia normal y los espacios intersticiales también permanecerán de manera normal. Extraído de F.O. Belzer and J.H. Southard, 1988.

La COP puede participar sobre:

- Variables como el contenido total de H₂O de los tejidos y su distribución en espacios intracelulares e intersticiales durante la perfusión hipotérmica.
- Generar gradientes de presión hidrostática bajos durante los procedimientos de perfusión, impidiendo la correcta perfusión del tejido.
- Las mismas variables luego de la perfusión normotérmica y sus efectos sobre el flujo, la resistencia intrahepática, el daño tisular y la producción de bilis.

Preservación estática (SCS, Simple Cold Storage)

Poco tiempo después de que Folkert Belzer comience con sus experimentos en preservación dinámica, Collins ⁵¹ desarrolló una nueva solución de preservación acelular, la cual trata de imitar la concentración de electrolitos en el medio intracelular. Con esta solución fue posible preservar órganos en frío de manera estática.

En el proceso de preservación de órganos se pueden definir tres fases: la fase de procuración, la de preservación propiamente dicha y por último la reperfusión. En la fase de procuración, el hígado donado es liberado de los ligamentos que lo sostienen y se le hace fluir solución de preservación fría para lavar los componentes sanguíneos del interior y enfriarlo de manera rápida. Luego de este lavado inicial, el hígado es extraído del donante y colocado en una bolsa llena con la misma solución de preservación. En este momento es cuando comienza la fase de preservación, y continúa colocando al hígado dentro de una conservadora llena de hielo. Para prevenir el contacto directo del órgano con el hielo y el subsecuente daño por congelamiento que esto podría ocasionar, se coloca una segunda bolsa llena de solución salina alrededor de la primera que contiene al órgano. Finalmente, se utiliza una tercera bolsa para cubrir las otras dos anteriores y asegurar las condiciones de esterilidad. De esta forma, el hígado será transportado hasta el quirófano donde será implantado (Figura 10).



Figura 10. Almacenamiento y traslado por la técnica de Simple Cold Storage (SCS).

Técnica utilizada de rutina en Argentina para preservar los órganos para trasplante.

La temperatura adecuada para la preservación estática está comprendida entre 0 y 4°C. En este rango de temperaturas, el metabolismo celular está reducido hasta

aproximadamente un 10% de la actividad normal a 37°C. De esta forma, la necesidad de oxígeno y nutrientes decrece, y la producción de desechos disminuye. Estas temperaturas son fácilmente alcanzables por enfriamiento con hielo.

La técnica de preservación por SCS ganó adeptos por sobre la preservación con máquinas de perfusión debido a su simpleza, a que no requiere de equipamiento sofisticado y además brinda facilidad para el transporte. Desde este momento la mayoría de los estudios se enfocaron en encontrar una solución de preservación óptima. A finales de la década del 60 y principios de los 70, soluciones de preservación como la solución Ringer lactato, la solución de Collins y luego la solución Euro-Collins mejoraron la viabilidad de los órganos luego de la preservación. De todas formas fue recién en los 80s cuando Belzer y sus colaboradores desarrollaron la solución de la Universidad de Wisconsin (UW) ^{33,89}, en este momento se pudo optimizar la técnica de SCS. A diferencia de las soluciones de preservación anteriores, la solución UW incluyó un agente no permeable para prevenir el hinchamiento celular o celular swelling. Con esta solución se pudieron preservar hígados durante 48 h en experimentos de laboratorio ^{90,91} y por 12-18 h en la clínica, comparadas con las 6 h que se habían logrado con la solución EuroCollins ⁹². Estos avances, junto con la introducción de agentes inmunosupresores más específicos, un mejor entendimiento y tratamiento de las complicaciones, fueron factores que mejoraron los resultados en el trasplante de órganos y convirtieron a la preservación estática de hígados, utilizando a la solución UW, en el método Gold Standard. Durante más de dos décadas ésta técnica no ha sufrido grandes modificaciones, las que se han realizado consistieron en el agregado de fármacos con el objetivo de revertir los efectos de la isquemia fría y acondicionar el órgano para la reperfusión.

HIPÓTESIS DE TRABAJO

En el campo de los trasplantes de órganos constantemente se buscan nuevas alternativas que permitan, no sólo conseguir mejores resultados, sino también extender el tiempo de preservación, mejorar la calidad de vida de los pacientes y mejorar los costos. Sin embargo, debido a que el trasplante hepático en los últimos años se ha convertido en el tratamiento de elección para la gran mayoría de las patologías que conducen a la falla hepática terminal, aumentó la demanda de órganos y la disponibilidad no alcanza a cubrir dicha demanda. Es por esto, que el principal objetivo de las investigaciones en preservación y trasplante, actualmente radica en lograr utilizar, con buenos resultados, los órganos provenientes de donantes a corazón no batiente (DCD) y ampliar la disponibilidad de órganos para trasplante. Este tipo de donación presenta la desventaja que los órganos han sufrido una fase de isquemia caliente (IC) ineludible que pesa sobre los órganos antes de que éstos deban afrontar la etapa de isquemia fría y la reperfusión en el cuerpo del receptor. No obstante, la calidad de un órgano a trasplantar depende esencialmente, de la eficiencia de la técnica de preservación utilizada para protegerlo durante el tiempo que deba permanecer fuera del organismo. Así, la etapa de preservación en frío puede contribuir al daño iniciado durante la IC; o bien, puede representar la oportunidad para re-acondicionar órganos marginales.

En este sentido, el desarrollo de un sistema de perfusión hipotérmica y de una solución de preservación, especialmente pensada para la utilización en dicho equipo, nos permitirá hacer empleo de hígados que han sufrido un período de isquemia caliente para el trasplante hepático, lo que ampliaría el pool de órganos disponibles.

OBJETIVOS



OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

Caracterizar los parámetros funcionales, bioquímicos y moleculares involucrados en la perfusión hipotérmica y SCS de hígados de rata para trasplante. Aplicar estos conocimientos al rescate de hígados provenientes de donantes a corazón no batiente con tiempos de isquemia controlados, a través de la máquina de perfusión hipotérmica, estudios *in vitro* y el trasplante hepático.

OBJETIVOS PARTICULARES

1. Diseñar un prototipo para la perfusión hipotérmica de órganos para trasplante en ratas.
2. Establecer las condiciones de flujo, presión y temperatura de perfusión que garanticen una óptima viabilidad de los hígados.
3. Realizar una caracterización fisicoquímica de la solución de preservación BGP-HMP y asegurar la demanda tisular de oxígeno a bajas temperaturas, determinando el tenor de oxígeno de la solución de perfusión/preservación.
4. Investigar los efectos de cada protocolo de perfusión/preservación mediante la reperusión normotérmica, utilizando el modelo de hígado aislado y perfundido de rata.
5. Caracterizar las alteraciones estructurales y funcionales que ocurren durante la preservación/perfusión/reperusión.
6. Evaluar la performance de la solución de preservación/perfusión BGP-HMP, de desarrollo propio, y compararla con la solución HTK, mediante las técnicas de perfusión hipotérmica y SCS.
7. Evaluar la performance de la solución de preservación BGP-HMP mediante la técnica de trasplante heterotópico de hígados de rata. Cotejar el rendimiento del protocolo con el obtenido para la solución comercial HTK.
8. Diseñar, utilizando la información obtenida en los experimentos previos, un prototipo portátil que pueda ser utilizado para transportar los hígados mientras son preservados, e implantarlos en otro laboratorio, con la idea de extrapolarlo a la clínica en un futuro.

ABREVIATURAS Y SÍMBOLOS

ALT (alanina aminotransferasa)
AST (aspartato aminotransferasa)
ADP (adenosina difosfato)
ATP (adenosina trifosfato)
ConsO₂ (consumo de oxígeno)
COP (presión coloidosmótica)
COR (recalentamiento controlado y con suministro de oxígeno)
DBD (donación luego de la muerte cerebral o donación a corazón batiente)
DCD (donación luego del paro cardíaco o donación a corazón no batiente)
FP (flujo portal)
HIF (factor Inducible por la hipoxia)
HMP (máquina de perfusión hipotérmica)
HTK (Solución Histidina-Triptófano-Cetoglutarato)
IC (isquemia caliente)
I/R (isquemia y reperfusión)
IPRL (sistema de perfusión de hígado de rata aislado)
KH (Krebs-Henseleit)
KHD (Krebs-Henseleit + Dextrán)
LDH (lactato deshidrogenasa)
LPT (long preservation time)
MMP (máquina de perfusión a temperaturas medias)
NADH (Nicotinamida adenina dinucleótido)
NF-κB (Factor nuclear κB)
NMP (máquina de perfusión normotérmica)
PB (producción de bilis)
pHMP (máquina de perfusión hipotérmica portátil)
RI (resistencia intrahepática)
SCS (preservación hipotérmica estática)
SD (desviación estándar)
SNMP (máquina de perfusión a temperaturas subnormotérmicas)
SPT (short preservation time)
U (cantidad de enzima que en una reacción enzimática, cataliza la conversión de 1 μmol de sustrato por minuto)
UW (solución de preservación de la Universidad de Wisconsin)

ANGLICISMOS

Blebs: protuberancias o burbujas en la superficie celular.

Buffer: es un sistema constituido por un ácido débil y su base conjugada o por una base y su ácido conjugado que tiene capacidad "tamponante", es decir, que puede oponerse a grandes cambios de pH (en un margen concreto) en una disolución acuosa.

Cellular swelling: hinchamiento celular.

COP (colloid osmotic pressure): presión coloidosmótica.

COR (Controlled oxygenated rewarming): recalentamiento controlado y con suministro de oxígeno.

DBD (donation after brain death): donación luego de la muerte cerebral.

DCD (donation after circulatory death): donación a corazón no batiente.

HMP (Hypothermic machine perfusion): máquina de perfusión hipotérmica.

IPRL (Isolated perfused rat liver): sistema de perfusión de hígado de rata aislado.

Kit: conjunto de reactivos para llevar a cabo una determinación.

MMP (Midthermic machine perfusion): máquina de perfusión a temperaturas medias.

NMP (Normothermic machine perfusion): máquina de perfusión normotérmica.

pHMP (portable hypothermic machine perfusion): máquina de perfusión hipotérmica portátil.

SCS (Simple Cold Storage): preservación hipotérmica estática.

SD (standard deviation): desviación estándar.

SNMP (Subnormothermic machine perfusion): máquina de perfusión a temperaturas subnormotérmicas.

Supercooling: proceso de enfriar un líquido por debajo de su punto de congelamiento sin que pase al estado sólido.

MATERIALES Y MÉTODOS



MATERIALES Y MÉTODOS

REACTIVOS Y EQUIPAMIENTO

DROGAS SÓLIDAS

Ácido cítrico anhidro, $C_6H_8O_7$

Adenosina, Sigma-Aldrich

Almidón hidroxietilado, gentilmente donado por el Dr. A. Sputtek, Alemania ⁹³

BES, MP Biomedicals

Bicarbonato de sodio ($NaHCO_3$), Merck

Carbonato de sodio (Na_2CO_3), Cicarelli

Citrato de sodio dihidratado, Cicarelli

Cloruro de calcio ($CaCl_2$), Cicarelli

Cloruro de potasio, Mallinckrodt

Cloruro de Sodio ($NaCl$), Anedra

Cloruro férrico hexahidratado ($FeCl_3 \cdot 6H_2O$), Cicarelli

Dextrano 70, Applichem

Diacetil monoxima, MP

Estreptomicina, Sigma-Aldrich

Fosfato de potasio diácido (KH_2PO_4), Merck

Fosfato de potasio dibásico (K_2HPO_4), Merck

Glicina, US Biological

Glucógeno, Merck

Gluconato de K, Sigma-Aldrich

Gluconato de Na, Merck

Glucosa, Biopack

Glutation, Sigma-Aldrich

Hidrato de Cloral, Parafarm

Hidróxido de potasio (KOH), Merck

Isoflurano Baxter, Aponor

Nicotinamida adenina dinucleótido (NADH), Sigma-Aldrich

Penicilina G sal sódica, ICN

Piruvato de sodio, ICN
Polietilenglicol 35000, Sigma-Aldrich
Sucrosa, MP Biomedicals
Sulfato de magnesio (MgSO_4), Anedra
Taurocolato de Sodio, Sigma-Aldrich
Tiosemicarbazida, ICN
Urea, Anedra

DROGAS LÍQUIDAS

Ácido clorhídrico (HCl), Anedra
Ácido fosfórico (H_3PO_4), Cicarelli
Ácido perclórico (HClO_4), Cicarelli
Ácido sulfúrico (H_2SO_4), Merck
Etanol, Sintorgan
Etilenglicol, Anedra
Formaldehído 37%, Anedra
Heparina, Sobrius
Patrones de pH de 7,00 y 10,00, Merck
Solución HTK, Custodiol®
Solución UW, ViaSpan®
Tramadol, *Algen LD*

KITS COMERCIALES WIENER LAB. Y ENZIMAS

α -amiloglucosidasa, Sigma-Aldrich
Alanina aminotransferasa GPT (ALT)
Aspartato aminotransferasa GOT (AST)
Glicemia enzimática

EQUIPAMIENTO

Agitadores magnéticos: Hanna HI 200M, Boeco MMS-3000

Baño ultrasónico Cleanson

Baños termostáticos: Dubnoff, Daihan Labtech, Memmert y PolyScience

Bomba peristáltica Masterflex

Cámara Cannon PowerShot A 620

Espectrofotómetro Libra S22, Biochrom

Bomba inyectora programable (Sage Instruments) para taurocolato

Microcentrífugas: Universal 32R, Hettich y Minispin, Eppendorf

Microscopio óptico Axiolab, Zeiss, Germany

Microscopio estereoscópico ,Zeiss, Germany

Oncómetro Osmomat 050, Gonotec, Germany

Osmómetro crioscópico Osmomat030, Gonotec, Germany

pHmetros: Denver Instruments y Hanna Instruments

Biological Oxygen Monitor 5300 y Oxygen Probe 5331, Yellow Spring Instruments

Termómetro digital Center 301 Type K

Triturador de tejido Ultraturrax t-25 basic + UT-dispersible tool T25. IKA® Works

Viscosímetro digital rotativo, (Shanghai Nirun Intelligent Tech., modelo SNB-2).

ANIMALES

Se utilizaron machos adultos de ratas de la cepa Sprague Dawley, cuyo peso corporal se comprendió entre 250-300 g. Todos los animales de laboratorio fueron obtenidos del Bioterio Central de la Facultad de Ciencias Médicas, UNR. Las ratas fueron mantenidas en las instalaciones del Centro Binacional (Argentina - Italia) de Investigaciones en Criobiología Clínica y Aplicada (CAIC) hasta el momento de la cirugía, a temperatura controlada (25°C) y con ciclos de luz/oscuridad de 12 h. El agua y los alimentos fueron suministrados *ad libitum*. Todos los experimentos que involucraron animales se realizaron de acuerdo a las reglamentaciones internacionales para el cuidado y manejo de animales de laboratorio, y con protocolos aprobados por la comisión de bioética para el manejo y uso de animales de laboratorio de la FBioyF-UNR (RESOLUCIÓN N°899/2011) y bajo declaración jurada ante el Comité Institucional para el Cuidado y Uso de los Animales de Laboratorio (CICUAL) de la Facultad de Ciencias Médicas, UNR. Durante el transcurso de ésta tesis en todo momento se procuró emplear la menor cantidad de animales y los mismos fueron tratados de

forma de provocarles el menor daño y sufrimiento posible dentro de nuestras posibilidades.

PROCEDIMIENTOS QUIRÚRGICOS

El Centro Binacional (Argentina - Italia) de Investigaciones en Criobiología Clínica y Aplicada posee una sala diseñada específicamente para realizar microcirugías en animales de laboratorio y todos los procedimientos fueron llevados a cabo en la misma. Dicha sala posee el mobiliario y el material de cirugía necesarios: mesa de cirugía, tabla adaptada para cirugía en pequeños animales con orificios para el drenaje de sangre y sujetadores para el posicionamiento del animal, lámpara con lupa incorporada, lámpara infrarroja, descarte de material corto punzante, llaves de suministro de carbógeno y aire medicinal, aire acondicionado, extractor de aire, etc.

Procuración a corazón batiente. Modelo de donante clásico (DBD)

Los animales fueron previamente anestesiados mediante una inyección de hidrato de cloral (50 mg/100 g peso corporal) de manera intraperitoneal. Al comprobarse que los mismos no respondieron a ningún estímulo fueron sujetos sobre el área de cirugía donde se llevó a cabo la apertura de la cavidad abdominal en forma de T invertida. Los intestinos fueron desplazados hacia el flanco izquierdo de cada animal, lo cual permitió la visualización de los grandes vasos abdominales. En este momento los animales fueron heparinizados a través de la vena femoral con 100 µL de solución salina de heparina (1000 UI/mL) con el objetivo de evitar la posible formación de trombos y obstaculización de la microcirculación hepática. Luego de aislar y ligar el esófago, el mismo fue seccionado con el fin de facilitar la posterior remoción del hígado. Se cateterizó el conducto biliar (colédoco) con un catéter PI-50 (Intramedic, USA) para evitar compresiones y reflujo biliar, así como para coleccionar las muestras de bilis durante la reperfusión. Posteriormente se procedió con la cateterización de la vena porta, para lo cual se empleó un catéter 14G (Abbocath, USA) de 2.1 mm de diámetro interno, y la arteria hepática fue ligada. En ese momento se encendió la bomba peristáltica (Masterflex, USA) y comenzó a perfundirse el hígado a través del catéter anteriormente colocado en la vena porta. La solución de lavado fue Krebs-Henseleit saturada con carbógeno (95% O₂ – 5% CO₂) a 10 mL/min y 37°C, con el fin de remover la sangre del órgano (lavado del órgano). A continuación se procedió a seccionar la vena cava inferior abdominal por debajo de las venas renales con el fin de liberar la presión dentro del órgano, y luego fue ligada firmemente. Por último, se abrió el diafragma y se introdujo un catéter de acero (3 mm de diámetro interno) en la vena suprahepática. Sin interrumpir la perfusión se terminaron de cortar los ligamentos hepáticos y se extrajo el hígado cuidadosamente.

Procuración a corazón parado. Modelo de donante marginal (DCD)

El procedimiento fue similar al descrito para los donantes clásicos, donde cada uno de los animales fue anestesiado y sujetado a la tabla de cirugía. Luego de la incisión de la cavidad abdominal se procedió con el aislamiento del esófago, cateterización del colédoco e introducción del catéter en la vena porta. En lugar de iniciar la perfusión, es

en este momento cuando se introduce la variante de este modelo; la misma radicó en la inducción del arresto cardíaco. El mismo se llevó a cabo mediante la inyección por vía femoral de 300 μ L de heparina 500 UI/mL + KCl 2M ⁹⁴. El ión K⁺ en altas concentraciones despolariza las membranas celulares del músculo cardíaco, lo cual genera el arresto cardíaco dentro de los 30 segundos. Con un estetoscopio se corroboró el cese del latido cardíaco y se cronometraron 45 minutos, la duración de la IC para nuestro modelo. Luego de transcurrido este tiempo de isquemia se inició la perfusión (10 mL/min) a través del catéter 14G introducido en la vena porta, con solución Krebs-Henseleit. Posteriormente se procedió de la misma manera que para el modelo de donante tradicional hasta la remoción del hígado de la rata.

TÉCNICAS DE PRESERVACIÓN

Preservación hipotérmica estática o SCS (Simple Cold Storage)

La preservación estática es la técnica que se utiliza con mayor frecuencia en la práctica clínica para preservar órganos para trasplante debido a su baja complejidad, su buena efectividad, es fácil de transportar y además es una técnica económica ⁹⁵. La misma se centra en los efectos beneficiosos del descenso rápido de la temperatura y en la utilización de soluciones de preservación especialmente diseñadas con el fin de atenuar las injurias inherentes al proceso de procuración, preservación y trasplante del injerto ⁹⁶ (contrarrestar el hinchamiento celular, prevenir la expansión del espacio intersticial y proveer las condiciones para el restablecimiento del ATP).

La técnica de preservación hipotérmica estática consiste en el lavado del órgano con solución de preservación fría, la cual se hace circular a través de los catéteres colocados en los vasos sanguíneos del órgano a ser procurado. Posteriormente el órgano es inmerso en un recipiente que contiene solución de preservación y es depositado en una conservadora con hielo. En nuestro caso, al finalizar la extracción del hígado, a partir del cuerpo del animal, se interrumpió la perfusión con buffer Krebs-Henseleit y se llevó a cabo un lavado con 20 mL de solución de preservación a 4°C. Seguido de esto, el hígado fue sumergido en 80 mL de la misma solución de preservación, en un frasco de vidrio (Boeco 100 mL, Alemania). El frasco conteniendo el hígado se cerró y fue almacenado dentro de una heladera, en una conservadora con hielo (4°C) durante 24 h (Figura 11).



Figura 11. Preservación hipotérmica estática de hígado de rata.

Máquina de perfusión hipotérmica (HMP)

Al momento de iniciar las pruebas de preservación dinámica de hígados de rata no contábamos con la máquina de perfusión necesaria, por lo que decidimos diseñar y construir una, para lo cual se debieron tener en cuenta una serie de puntos.

Los parámetros de perfusión son fundamentales, y como se describió anteriormente, una de las principales ventajas que presenta la preservación dinámica es la capacidad de monitorear dichos parámetros durante la totalidad del período de preservación. Esto es importante, debido a que los valores y las tendencias en los patrones de presión y flujo, así como la resistencia vascular del órgano, pueden utilizarse para predecir si la viabilidad del órgano será adecuada luego de la preservación. Además, cabe recordar que uno de los efectos producidos por la hipotermia es la vasoconstricción, lo que además, promueve que las células endoteliales sean frágiles y más propensas a lesiones inducidas por el esfuerzo de cizallamiento que ejerce el flujo. Por lo tanto, el control adecuado de la presión es esencial para prevenir lesiones en la pared de los vasos y a las células endoteliales, como resultado de un flujo y presión de perfusión demasiado altos. Al controlar la presión de perfusión, el flujo se vuelve dependiente de la resistencia vascular del hígado y ninguno de los dos puede llegar a ser demasiado alto. De este modo, al utilizar un sistema que trabaje a presión constante, la tensión de cizallamiento en los vasos nunca puede ser demasiado alta y se evita el daño de las células endoteliales.

Otro punto a considerar es que, a pesar que la hipotermia disminuye el metabolismo celular, el hígado aún consume oxígeno durante la preservación mediante la máquina de perfusión hipotérmica^{81,82,97}. Al consultar la bibliografía se encontraron diversos reportes en los cuales se obtienen mejores resultados al suministrar oxígeno adicional durante la perfusión^{98,99}.

Una condición no menor es la autonomía de trabajo que debe garantizar la máquina de perfusión. Para el presente trabajo, pensando en un tiempo de preservación exagerado en relación a lo que habitualmente se emplea en la práctica clínica, no más de 12 h de preservación^{100,101}, se debía garantizar un período de trabajo de al menos 24 h, lo que implica una capacidad de enfriamiento suficiente para mantener las condiciones hipotérmicas dentro del rango de 0 a 4°C durante 24 h. Además, es importante contar con un sensor de temperatura para monitorear la temperatura del órgano y de la solución durante todo el período de preservación.

Teniendo en cuenta todo lo anteriormente mencionado, el diseño de un sistema de perfusión hipotérmica presenta el desafío de lograr una dinámica de perfusión óptima y una oxigenación suficiente a bajas temperaturas, así como también una autonomía adecuada.

Descripción de la máquina de perfusión hipotérmica (HMP) diseñada

El concepto inicial del sistema HMP se basa en el almacenamiento en frío convencional, es decir, el hígado está sumergido en solución de preservación que se coloca en una caja de enfriamiento a bajas temperaturas. Este concepto se mantuvo, con el agregado de un sistema de bombeo y un oxigenador.

Fotografías de la HMP en detalle se muestran en la figura 12. La misma consiste en un reservorio que contiene la solución de preservación/perfusión, un aireador, un

soporte para la muestra, una bomba peristáltica, un medidor de flujo, un manómetro hidrostático, un filtro, un atrapa burbujas que se conecta con una llave de tres vías, sondas para medir pH y temperatura del sistema, cañerías de silicona y un baño termostático.

El hígado se sitúa sumergido en una cámara termostática que funciona de soporte para el mismo, la cual permite que el perfusato al salir del hígado recircule y alcance nuevamente el reservorio para la solución de preservación. En la misma cámara también se insertaron un sensor de temperatura y el electrodo de pH de vidrio para monitorear la evolución de la temperatura y el pH durante el funcionamiento de la HMP. Cada hígado es perfundido durante 24 h con solución de preservación a la temperatura de trabajo elegida (5 o 10°C). La presión es mantenida de manera constante y cuidadosa (40 mmH₂O), por lo que el flujo de perfusión dependerá de cómo se adapte cada hígado a dicha presión de trabajo.

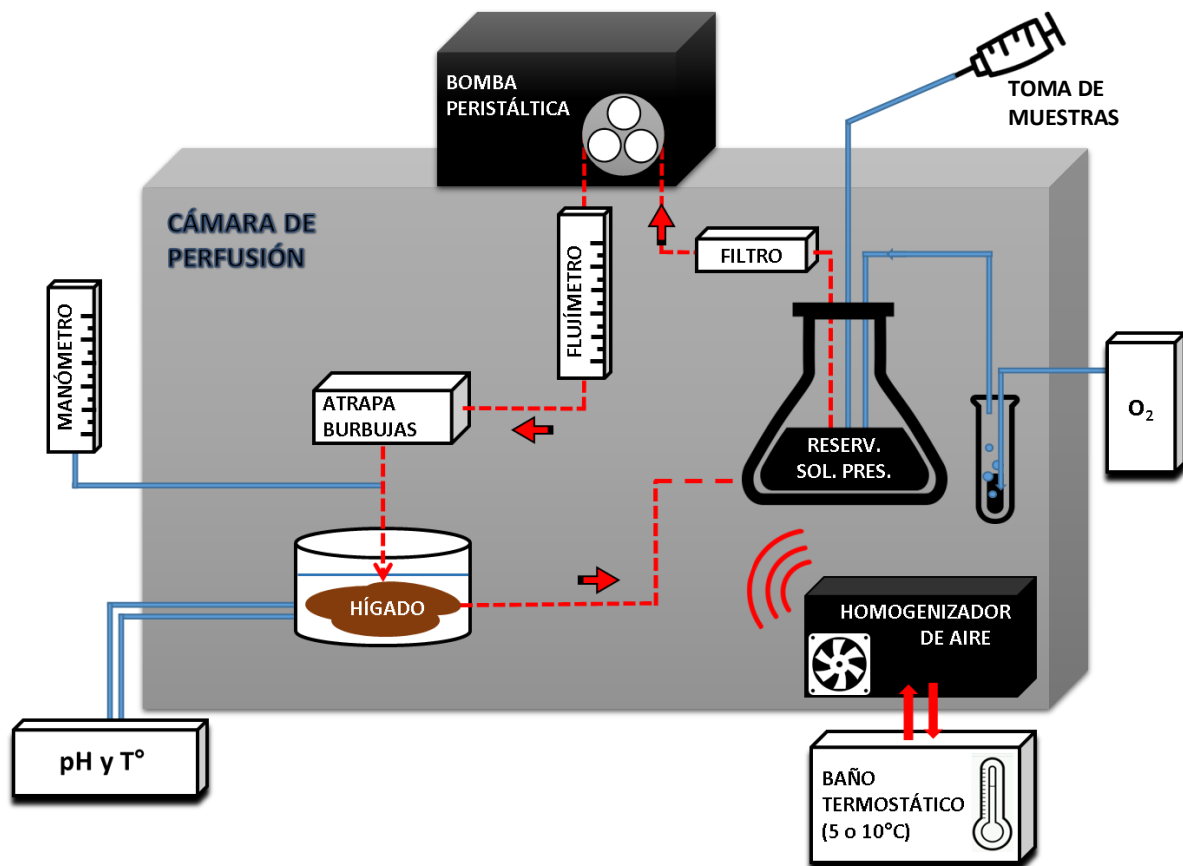


Figura 12. Máquina de perfusión hipotérmica diseñada para realizar los experimentos de preservación dinámica de hígados de rata. Esquema del sistema con todas las partes constituyentes.

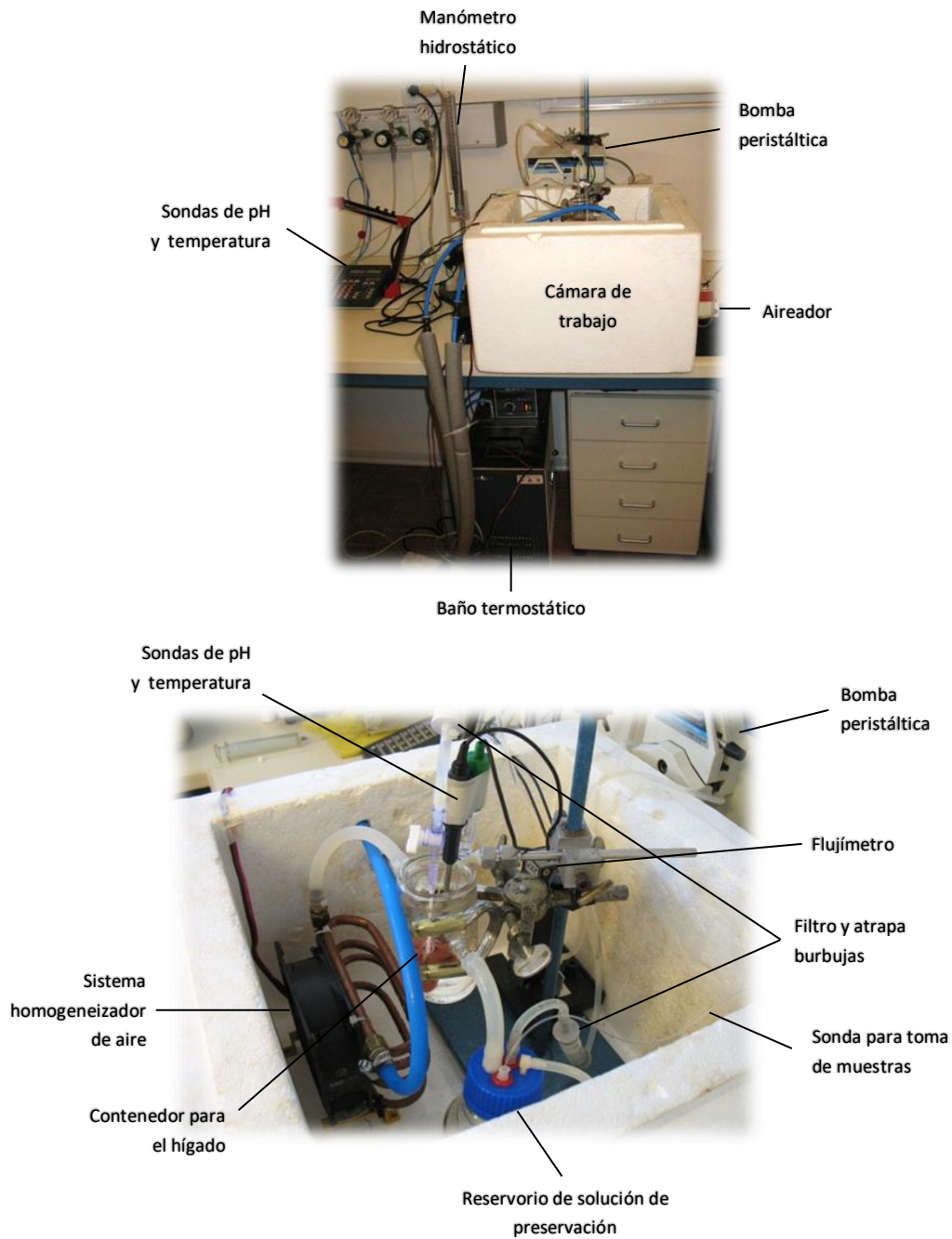


Figura 12 continuación. Máquina de perfusión hipotérmica diseñada para realizar los experimentos de preservación dinámica de hígados de rata. Fotografías del equipo completo.

Descripción de las piezas del sistema:

- Cámara refrigerada de perfusión
- Reservorio para la solución de preservación
- Sistema homogeneizador de aire
- Flujímetro
- Soporte para el hígado
- Sensor de temperatura y electrodo de pH

- Filtro de nylon y atrapador de burbujas
- Llave de paso de tres vías
- Bomba peristáltica
- Oxigenador
- Manómetro hidrostático
- Jeringa para tomar muestras de perfusato
- Baño termostático

Cámara de perfusión

La cámara de perfusión es una caja de material aislante (poliestireno expandido o telgopor®) de 7 cm de espesor conformada por dos partes, una caja principal (31,8 cm x 32 cm de base y 24 cm de alto) y una tapa complementaria (30,2 cm x 21,8 cm de base y 21,8 cm de alto). En dicha caja se regula la temperatura por medio de la circulación de H₂O/Etilenglicol 50% (v/v) a través de una serpentina de cobre interior y que proviene desde un baño termostático enfriador.

La mayoría de los demás componentes del sistema se situaron dentro de la cámara de perfusión:

- **Reservorio para la solución de preservación**

Un frasco de vidrio de 250 mL (Boeco, Alemania) con tapa a rosca. En la misma se realizaron perforaciones para conectar las tuberías de entrada y salida de la solución de preservación, para tomar muestras de la solución y para conectar el aireador.

- **Sistema homogeneizador de aire**

Para disipar el aire y homogeneizar la temperatura dentro de la cámara de perfusión se instaló un ventilador (12 cm de diámetro) alimentado por una fuente de 12 V. El intercambiador de calor consistía en una serpentina de cobre sujeta al ventilador, y por la misma circula líquido refrigerante (H₂O/Etilenglicol 1:1) proveniente de un baño termostático (Daihan Labtech Co., Ltd., Corea del Sur).

- **Flujímetro**

Se utilizó uno de aluminio de 65 mm, capaz de medir hasta 48.7 mL/min (Cole-Parmer, USA). Para poder correlacionar de manera directa la unidad de escala observada en el flujímetro con un valor de flujo, se realizó una calibración a diferentes temperaturas (5 y 10°C); dicha puesta a punto se describe en una tesis de licenciatura publicada por nuestro grupo de trabajo ⁹⁷. Se obtuvieron las ecuaciones de ajuste correspondientes y se determinó que la relación flujo vs. unidades de medida es exponencial para ambas temperaturas (Figura 13).

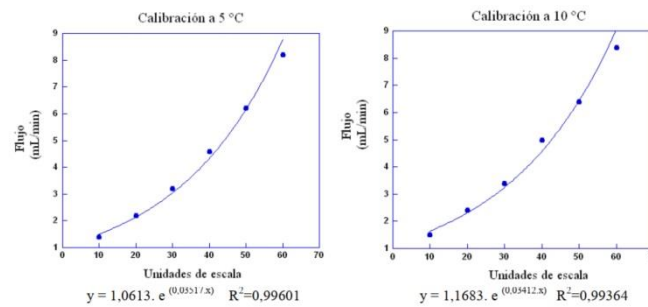


Figura 13. Curvas de calibración realizadas para el flujímetro Cole-Parmer y sus ecuaciones de regresión exponencial a 5 y 10°.

- **Soporte para el hígado**

El hígado se posiciona sumergido en solución de preservación, dentro de una camisa de vidrio termostatzada a través del líquido refrigerante proveniente del baño termostático, y que previamente pasa por el sistema homogeneizador de aire. La camisa termostatzada a su vez posee un orificio de salida por el cual la solución de preservación/perfusato vuelve a ingresar al reservorio de solución de preservación generando que el sistema sea recirculante.

El hecho de permitir que el hígado permanezca sumergido en solución de preservación fría durante la preservación, permite que, en caso de ausencia de perfusión por algún fallo en el sistema, el órgano aún se preserve utilizando el método de almacenamiento en frío estático o SCS.

- **Sensor de temperatura y electrodo de pH**

Con el objetivo de monitorear la temperatura, el pH de la solución de preservación y la corrección del mismo por la temperatura durante la totalidad del período de preservación, se utilizaron sondas de pH y temperatura conectadas a un pH-metro (Hanna Instruments, USA). Dichas sondas se colocaron dentro de la camisa termostatzada que contiene al hígado sumergido en solución de preservación.

- **Filtro de nylon y atrapador burbujas**

Se utilizaron filtros extraídos de equipos de trasfusión de sangre convencionales. El primero fue colocado inmediatamente luego del contenedor de solución de preservación, con motivo de atrapar cualquier partícula o coágulo que se encuentre circulando por el sistema. Un segundo filtro se situó justo antes de la llave de tres vías, donde se conecta el catéter colocado en la vena porta del hígado, su función es atrapar cualquier burbuja que se encuentre circulando y pueda ingresar al hígado.

- **Llave de paso de tres vías**

Una llave de policarbonato de tres vías se colocó inmediatamente después del filtro atrapador de burbujas, para que funcione como vía de paso del perfusato hacia el hígado. Además, se conectó un manómetro hidrostático a la misma.

Bomba peristáltica

El flujo de perfusión fue regulado mediante una bomba peristáltica a rodillos (Masterflex®, USA con un cabezal Easy-load Masterflex® L/S, Cole Parmer, USA). Este tipo de bomba utiliza dos o más rodillos que realizan un movimiento peristáltico al apretar alternadamente un tubo que contiene fluido. Dependiendo de la cantidad de rodillos, el flujo resultante es pulsátil o casi continuo. Se utilizó una tubería recomendada por el proveedor (Masterflex®, USA modelo HV-96400-16). La tubería es de silicona y presenta un diámetro de 3,1 mm; tolera presiones de hasta 2,7 bares y puede resistir sin problemas rangos de temperaturas comprendidos entre -50 y 230°C.

La bomba peristáltica succiona la solución de preservación desde el reservorio de la misma, por medio de una manguera de silicona. La solución primeramente se hace pasar por un filtro, luego a través del flujímetro, y previo paso por un atrapador de burbujas perfunde al hígado. Al ser un sistema recirculante, una vez que la solución de preservación sale del hígado, pasa nuevamente hacia el reservorio y comienza nuevamente el circuito.

Oxigenador

En nuestro laboratorio contamos con datos de mediciones de solubilidad de oxígeno realizadas en diversas soluciones de preservación y a diferentes temperaturas, así como datos de extracción de oxígeno a diferentes temperaturas. A bajas temperaturas los hígados presentaron una actividad respiratoria menor al 5% respecto al valor obtenido trabajando a 37°C⁹⁷. Lo anteriormente mencionado pone en evidencia que no es necesario perfundir el tejido con altas concentraciones de O₂ cuando es preservado a bajas temperaturas, además evita la formación de especies reactivas del oxígeno (ver apartado solubilidad de O₂ en la solución de preservación BGP-HMP, página 52). Si bien la solubilidad del O₂ en la solución BGP-HMP es menor que para el agua, debido a que la misma es una mezcla compleja de agentes osmóticamente activos y otros solutos, lo que genera interacciones entre las especies moleculares en la solución, no será necesario saturar nuestra solución de preservación con oxígeno (carbógeno, 95% O₂ – 5% CO₂). De esta forma, para suministrarle una cantidad suficiente de oxígeno durante la HMP al hígado, se seleccionó un aireador convencional de pecera el cual bombea 1,5 L de aire atmosférico por minuto. Antes de burbujear a la solución de preservación, el aire se hace pasar por un contenedor con H₂O_d para evitar arrastrar impurezas hacia la solución de preservación.

Manómetro hidrostático

Se instaló un manómetro hidrostático para determinar la presión portal de entrada al hígado en mmH₂O durante la perfusión hipotérmica del mismo. El manómetro fue conectado a la llave de tres vías situada justo antes del ingreso de perfusato al hígado. La presión portal en combinación con el flujo de perfusión nos permite calcular la resistencia vascular del órgano como medida de la viabilidad del mismo.

Jeringa para toma de muestras

La extracción y toma de muestras de perfusato durante la perfusión hipotérmica fue realizada mediante una jeringa de vidrio de 3 mL. La misma fue equipada con un catéter inserto directamente en el frasco contenedor de solución de preservación.

Baño termostático

La preservación de órganos a temperatura corporal (normotermia) tiene algunas ventajas como por ejemplo la de mantener el metabolismo normal y minimizar la acumulación de sustratos dañinos para las células durante la preservación. Por lo tanto, este tipo de preservación puede conducir a un mejor resultado, además, permite evaluar la viabilidad durante la preservación, ya que el órgano se mantiene en pleno funcionamiento ⁵⁴. Sin embargo, la preservación a la temperatura corporal es más compleja e implica complicaciones adicionales. Se necesita incluir sangre completa, glóbulos rojos purificados, o compuestos sintéticos portadores de oxígeno, la temperatura debe mantenerse rigurosamente y es obligatoria la adición de nutrientes a la solución de perfusión.

Por lo expuesto anteriormente, entre otras cosas, se ha optado por emplear temperaturas de preservación hipotérmicas (0-10°C), las cuales deben mantenerse durante todo el período de preservación. Para ello se empleó un baño termostático con circulación (Daihan Labtech Co., Ltd., Corea del Sur) que permite regular y fijar la temperatura de la cámara de perfusión de manera electrónica todo el tiempo que sea necesario.

Operación de la máquina de perfusión hipotérmica

Para operar la máquina de perfusión hipotérmica es sumamente importante revisar todos los componentes del sistema y dejarla en condiciones previamente a comenzar la cirugía de procuración del hígado. En un primer momento se carga la camisa termostatzada que actúa como soporte para el hígado con 250 mL de solución de preservación fría. Posteriormente se enciende el baño termostático para que inicie la circulación del líquido refrigerante por la cámara de perfusión, en el mismo se fija una temperatura inicial de 15°C. Finalmente se enciende el ventilador para homogeneizar el aire dentro de la cámara de perfusión, se calibra el pHmetro, se eliminan todas las burbujas que puedan estar circulando por las cañerías y se enciende el aireador de pecera para que la solución de preservación comience a saturarse.

Una vez que se han tomado todos los recaudos anteriormente mencionados y la máquina de perfusión hipotérmica se encuentra en condiciones de ser operada, se procede a realizar la cirugía de procuración del hígado. Posteriormente, el mismo es trasladado hacia la máquina y se conecta mediante el catéter 14G introducido en la vena porta. De esta manera, el hígado queda colgando dentro del soporte para el mismo y sumergido en la solución de preservación, evitando de esta manera posibles contorciones y estrangulaciones de los vasos hepáticos que puedan dificultar la correcta perfusión del hígado. Cabe destacar que en última instancia, el parámetro que

nos revela alguna anomalía en la posición de los catéteres, obstrucción o estrangulación es la presión hidrostática.

El hígado comienza a perfundirse lentamente, la velocidad y flujo de perfusión son incrementados gradualmente hasta alcanzar una presión portal de trabajo constante de 40 ± 5 mmH₂O (aproximadamente el 25% de la presión portal normotérmica). Para lograr trabajar a presión constante se reguló el flujo de perfusión (osciló entre 0,23 y 0,35 mL/min.g híg) siempre que fue necesario. La temperatura de trabajo es disminuida de manera gradual, hasta llegar a 4°C dentro de las dos primeras horas de perfusión. La temperatura es medida constantemente mediante una sonda colocada en la cámara que contiene al hígado y conectada al pHmetro Hanna Instruments. Se realizan 24 h continuas de preservación por perfusión y posteriormente el hígado se traslada hacia el sistema de hígado aislado y perfundido (IPRL). Durante la preservación se toman muestras de perfusato a las 0, 5, 20 y 24 horas de perfusión (tiempos 0, 1, 2 y 3 respectivamente) para determinar los niveles de las enzimas hepáticas LDH, AST y ALT presentes en el perfusato.

SOLUCIONES DE PRESERVACIÓN EN FRÍO

Para que un procedimiento de trasplante sea exitoso, la integridad del órgano a ser injertado es clave. El mismo debe recuperar rápidamente su función al restablecer el flujo sanguíneo en el cuerpo del receptor luego de ser preservado e injertado. Para ello, existen dos factores fundamentales:

- Hipotermia (0-4°C): permite disminuir las demandas metabólicas del tejido durante su almacenamiento y/o transporte.
- Solución de preservación: las soluciones de preservación están especialmente diseñadas con el propósito de disminuir, en el mayor grado posible, todos aquellos mecanismos de injuria generados por la isquemia fría (depleción de ATP, desbalance iónico, estrés oxidativo, inflamación, etcétera).

Durante los experimentos llevados a cabo en el marco de la presente tesis doctoral se emplearon dos soluciones de preservación diferentes:

Solución Histidina, Triptófano y Cetoglutarato (HTK) CUSTODIOL®

Esta solución, diseñada por Bretschneider, fue originalmente pensada para cirugías cardíacas, pero en la actualidad es ampliamente utilizada en la preservación hepática y renal, experimental y clínica (Figura 14) ¹⁰². Se caracteriza por su bajo contenido en iones (Na⁺, K⁺ y Mg²⁺) y su baja viscosidad, que la convierten en una solución segura para la liberación directa en el sistema circulatorio del receptor y de enfriamiento y lavado más rápidos. Sus principales componentes son la Histidina (alto poder buffer), el Manitol (barrera osmótica) y aminoácidos de baja permeabilidad (triptófano y ácido α -cetoglutarico) que estabilizan las membranas plasmáticas y son sustratos para el metabolismo anaeróbico ¹¹.

Un beneficio muy atractivo de la solución Custodiol® es su bajo costo respecto de la solución UW. Este beneficio, sumado a los buenos resultados obtenidos en la preservación de riñón, corazón e hígado ¹⁰², como así también a la imposibilidad de abastecernos de solución UW por cuestiones relacionadas al suministro comercial, nos impulsaron a escoger para nuestros experimentos a la solución HTK.



Figura 14. Una de las presentaciones comerciales de la solución CUSTODIOL® (HTK).

Solución BGP-HMP y modificaciones

En la bibliografía se encuentran numerosos trabajos experimentales y clínicos, los cuales indican que la preservación de órganos provenientes de donantes marginales por HMP es superior a la preservación estática por SCS ^{103,104}. Sin embargo, aún existen dudas acerca de cuál es la mejor solución de preservación para la técnica de HMP ^{41-43,105}.

A raíz de esto, decidimos desarrollar una nueva solución de preservación basada en BES-Gluconato-Polietilenglicol (BGP-HMP). Con esta solución se busca proteger el injerto proporcionando una concentración de oxígeno adecuada, y manteniendo el pH y el control oncótico vascular durante el proceso de HMP. Nuestro anhelo final es lograr una solución capaz de ser utilizada para preservar todos los órganos abdominales, así como también, mediante alguna simple modificación en su composición, capaz de ser empleada con la técnica dinámica como así también con la técnica estática de preservación.

En la tabla 1 se detalla la composición química de la solución BGP-HMP, como así también de la solución HTK.

Caracterización fisicoquímica de la solución de preservación BGP-HMP

Determinación de la capacidad buffer

Como fue detallado anteriormente, uno de los efectos adversos que presenta la isquemia fría es la acidificación intracelular ocasionando daño celular. Por lo tanto, el control de la acidosis durante la preservación a temperaturas hipotérmicas es un

factor importante para mantener la viabilidad celular durante el proceso. Para determinar la eficiencia con la que la solución BGP-HMP regula el pH durante la perfusión hipotérmica, determinamos su capacidad buffer y luego la comparamos con la obtenida para la solución comercial Custodiol®.

Tabla 1. Composición química de las soluciones BGP-HMP y HTK.

Composición		BGP-HMP	Composición	HTK
Impermeantes (mM)			Impermeantes (mM)	
K ⁺ Gluconato		7	Manitol	30
Na ⁺ Gluconato		100		
Sucrosa		20		
Buffers (mM)			Buffers (mM)	
KH ₂ PO ₄		2.5	Histidina.HCl.H ₂ O	18
BES		30	Histidina	180
			Triptófano	2
Coloides (mM)				
PEG 35 kDa		0,03 mM 1 (g/L)		
Sustratos y electrolitos (mM)			Sustratos y electrolitos (mM)	
MgSO ₄		5	NaCl	15
Glutación		3	KCl	9
Adenosina		5	MgCl ₂ .6H ₂ O	4
Glicina		15	CaCl ₂ .H ₂ O	0,015
			α-cetoglutarato	1
Antibióticos				
Estreptomicina (mg/mL)		0.25		
Penicilina G (UI/mL)		10		

La capacidad buffer de una solución se define como el número de mEq de H⁺ necesarios para disminuir en una unidad el pH de 1 L de la misma. Para determinar la capacidad buffer de la solución BGP-HMP se titularon 50 mL de la solución de preservación, a 5 y 10°C, con HCl 0,1 N y se registró el pH obtenido luego de la adición de alícuotas de 1 mL del ácido. El HCl fue previamente titulado utilizando como patrón primario Na₂CO₃, el cual fue secado en estufa a 100°C durante 1 hora y luego dejado en desecador a temperatura ambiente para posteriormente pesarlo. Se utilizó como indicador naranja de metilo 0,1% p/v. El pH de la solución BGP-HMP fue regulado a 7,40 a temperatura ambiente en el momento de su preparación.

Se graficó el pH en función del volumen de HCl 0,1 N consumido, y se calculó la capacidad buffer a partir de las ecuaciones de regresión obtenidas. Para realizar la titulación se construyó un sistema constituido por los siguientes elementos (Figura 15):

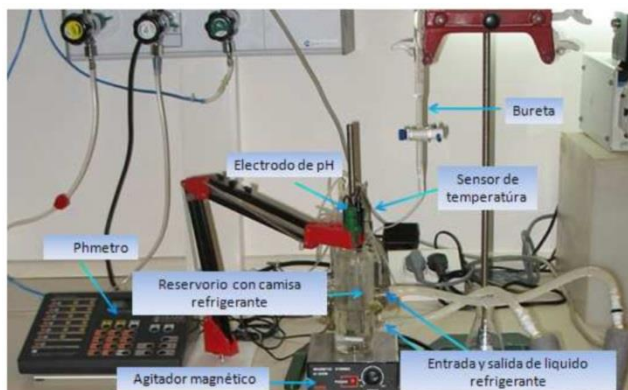


Figura 15. Sistema empleado para determinar la capacidad buffer de las soluciones de preservación. Se añaden alícuotas del titulante (HCl 0,1 N) de volumen conocido a la solución a la cual queremos determinar su capacidad buffer y medimos el pH para cada agregado. La bureta es conectada a la solución mediante un catéter.

- Reservorio para la solución con camisa de enfriamiento

El mismo es un contenedor de vidrio que posee orificios de entrada y salida por los cuales circula el líquido refrigerante y permite regular la temperatura de la solución contenida en el mismo. Como refrigerante se utilizó una mezcla de H₂O/Etilenglicol 50% (v/v) cuya temperatura se fijó con el baño termostático Daihan Labtech Co., Ltd., Corea del Sur.

- Sensor de temperatura y pHmetro

La temperatura y el pH de la solución en estudio fueron medidos utilizando los sensores correspondientes al pHmetro Hanna Instruments (Hanna HI 9017 Microprocessor). El pHmetro fue calibrado a 5 y 10°C con soluciones patrones de pH de 7,00 y 10,00 (Merck, Alemania).

- Agitador magnético

Se utilizó un agitador magnético Hanna HI 200M para homogeneizar la solución durante todo el procedimiento de titulación.

Cálculo de la capacidad buffer

A partir de la pendiente m de la ecuación de ajuste podemos calcular la capacidad buffer:

$$CB = [(C_{HCl}/|m|).1000]/V_{Sol. BGP-HMP} \quad Ec. 2$$

CB: capacidad buffer de la solución (mEq H^+ / UpH/ L Sol.).

C_{HCl} : concentración de HCl determinada previamente por titulación (en nuestro caso fue de 0,097 N).

m : valor absoluto de la pendiente de la ecuación de regresión lineal.

$V_{Sol. BGP-HMP}$: volumen de solución BGP-HMP (en nuestro caso fue de 50 mL).

Determinación del punto de congelamiento

Para determinar el punto de congelamiento de la solución de preservación BGP-HMP se registraron las curvas de descenso de la temperatura en función del tiempo. Para ello se emplearon un baño refrigerado (Polyscience Mod. 9501) cuya temperatura se fijó en $-10^{\circ}C$ y un termómetro digital (Center 301 Type K) conectado a una computadora mediante una interface RS 232. Con el software Thermolink L se llevó a cabo el registro de las curvas. El termómetro utilizado posee 2 sondas, una de las cuales se colocó en el tubo de ensayo que contenía la solución de interés, mientras que la otra se sumergió en el baño termostático. Una vez que la solución entra en contacto con el baño, ocurre una disminución abrupta de su temperatura, permaneciendo en estado líquido aún por debajo de su punto de congelamiento; fenómeno conocido como supercooling. El estado de supercooling es muy inestable, de este modo, sembrando un cristal de hielo ocurre el congelamiento de forma espontánea. A partir de las gráficas obtenidas se determinó el punto de congelamiento correspondiente. Se registraron las curvas de descenso de la temperatura del agua destilada como referencia, la cual posee un punto de congelamiento teórico igual a $0^{\circ}C$. Se utilizaron 3 mL de solución BGP-HMP y de agua destilada respectivamente.

El mismo procedimiento fue realizado para determinar el punto de congelamiento de la solución HTK (solución Breschneider) y así tomarla como solución de referencia.

Cálculo del punto de congelamiento teórico de la solución BGP-HMP

Para calcular el valor teórico del punto de congelamiento de la solución BGP-HMP utilizamos la ecuación de la ley de Raoult para el descenso crioscópico:

$$\Delta T_c = K_f.Osm \quad Ec. 3$$

ΔT_c : descenso crioscópico; diferencia entre el punto de congelamiento del agua pura ($T_{c\ H_2O}$) y de la solución ($T_{c\ Sol.}$).

K_f : constante crioscópica; es característica del solvente ($^{\circ}C/osmol\ ste$).

Osm: osmolaridad de la solución (osmol/L).

Aplicando la ecuación en nuestro sistema:

$$\Delta T_c = K_f\ H_2O \cdot Osm_{Sol. BGP-HMP}$$

Ec. 4

ΔT_c : descenso crioscópico; diferencia entre el punto de congelamiento del agua pura ($T_{c\ H_2O}$) y de la solución BGP-HMP ($T_{c\ Sol. BGP-HMP}$), donde $T_{c\ H_2O}$ es $0^{\circ}C$.

$K_f\ H_2O$: constante crioscópica del H_2O , su valor es $1,86^{\circ}C/osmol\ de\ H_2O$.

Osm_{Sol. BGP-HMP}: osmolaridad de la solución BGP-HMP, su valor es $0,297\ osmoles/Kg\ H_2O$.

Despejando $T_{c\ Sol. BGP-HMP}$ de la llegamos a la siguiente expresión:

$$T_{c\ Sol. BGP-HMP} = K_f\ H_2O \cdot Osm_{Sol. BGP-HMP} + T_{c\ H_2O}$$

Ec. 5

Determinación voltamperométrica de la concentración de O_2 disuelto en la solución de preservación/perfusión BGP-HMP

Uno de los interrogantes para el cual aún existe controversia es la necesidad de oxigenar la solución de preservación cuando se emplea la técnica de perfusión a temperaturas hipotérmicas (HMP). Para poder contestar esta pregunta, o tener más certezas a la hora de planificar un protocolo de preservación por HMP es necesario estimar el consumo de O_2 de hígados al ser perfundidos con la solución de preservación-perfusión en estudio. A tal fin, primero se hace necesario conocer la concentración de O_2 presente en la misma.

En trabajos previos de nuestro grupo se realizaron mediciones de la solubilidad de O_2 en las soluciones de preservación BGP-HMP y Custodiol (HTK), como así también del consumo de oxígeno de hígados de rata perfundidos a 5 y $10^{\circ}C$ ¹⁰⁶. De los métodos existentes para determinar la concentración de O_2 en medios biológicos, se optó por el más utilizado actualmente, la voltamperometría de O_2 . Se empleó la técnica descrita por Rasmussen y Rasmussen ¹⁰⁷, previamente modificada en nuestro laboratorio para poder adaptarla a nuestro sistema y a las condiciones en las cuales realizaremos las mediciones ¹⁰⁸.

Fundamento teórico: método descrito por Rasmussen y Rasmussen

La solubilidad del O_2 (C_{O_2}) en una solución acuosa de compuestos está relacionada con su solubilidad en agua pura ($C_{O_2}^\circ$), a través del cociente de solubilidad q :

$$q = C_{O_2}/C_{O_2}^\circ \quad \text{Ec. 6}$$

El valor de q depende del soluto, de su concentración y de la temperatura.

Esta relación también puede expresarse como:

$$C_{O_2} = q.C_{O_2}^\circ \quad \text{Ec. 7}$$

En conclusión, la concentración de O_2 en la solución a la presión atmosférica de trabajo podría calcularse a partir del valor conocido de $C_{O_2}^\circ$ a la temperatura de trabajo si se conociera el valor de q . Este método permite calcular q a partir de mediciones voltamperométricas.

Cálculo de q a partir de las señales del electrodo: para un electrodo que responde linealmente, la señal de salida está dada por:

$$i_{lim} = \alpha.pO_2 + \beta \quad \text{Ec. 8}$$

α : constante que depende de las características del sensor.

pO_2 : presión de O_2 en el medio.

β : corriente oscura (señal electrónica del sensor en ausencia de O_2 en el medio).

La presión de O_2 puede expresarse en función de la concentración de O_2 en el medio, de acuerdo a la Ley de Henry:

$$i_{lim} = \alpha.C_{O_2}/k_{O_2} + \beta \quad \text{Ec. 9}$$

C_{O_2} : concentración de O_2 en el medio.

k_{O_2} : constante de Henry del O_2 .

La constante α está determinada por varios factores: la ganancia del amplificador, el área superficial del electrodo, las propiedades de la membrana, la velocidad de agitación y la temperatura.

Luego del agregado de una alícuota de volumen V_S de la solución de interés a la cámara de volumen V_C , la concentración de O_2 en la cámara aumenta de C_1 a C_2 y un volumen V_S de concentración C_1 es desplazado hacia afuera de la cámara. El balance de masa para el agregado es:

$$n_{c,f} = n_{c,i} + n_s - n_s' \quad \text{Ec. 10}$$

$n_{c,f}$: número de moles de O_2 en la cámara después del agregado.

$n_{c,i}$: número de moles de O_2 en la cámara antes del agregado.

n_s : número de moles de O_2 agregados.

n_s' : número de moles de O_2 que salen de la cámara.

Una expresión equivalente para el balance es la siguiente:

$$V_C \cdot C_2 = V_C \cdot C_1 + V_S \cdot C_S - V_S \cdot C_1 \quad \text{Ec. 11}$$

Que puede reordenarse como:

$$C_S = C_1 + (C_2 - C_1) \cdot V_C / V_S \quad \text{Ec. 12}$$

C_S : concentración de O_2 de la solución de interés.

Los valores de las constantes k_{O_2} , α y β no cambian por el agregado de la solución en estudio. Por lo tanto, las ecuaciones 8 y 11 pueden combinarse para dar:

$$I_S = I_1 + (I_2 - I_1) \cdot V_C / V_S \quad \text{Ec. 13}$$

I_S : señal que se observaría para la solución en estudio si ésta estuviera en la cámara bajo las mismas condiciones experimentales, es decir, con k_{O_2} , α y β tomando los mismos valores.

Haciendo el mismo análisis para el agregado de una alícuota de agua pura equilibrada con O_2 bajo las mismas condiciones de temperatura y presión en que fue equilibrada la solución en estudio, puede definirse:

$$I_H = I_1 + (I_2 - I_1) \cdot V_C / V_H$$

Ec. 14

I_H : señal que se observaría para el agua pura si ésta estuviera en la cámara bajo las mismas condiciones experimentales, es decir, con k_{O_2} , α y β tomando los mismos valores.

V_H : volumen de la alícuota de agua.

Como el agua y la solución en estudio se equilibran bajo las mismas condiciones de temperatura y presión, y como k_{O_2} , α y β toman los mismos valores para ambas series de agregados, las ecuaciones 5 y 8 pueden combinarse para obtener:

$$q = C_{O_2} / C_{O_2}^{\circ} = (I_S - \beta) / (I_H - \beta)$$

Ec. 15

Si β se ajusta a un valor pequeño, entonces q puede calcularse simplemente a partir del cociente entre I_S e I_H , que se calculan a partir de las ecuaciones 13 y 14, respectivamente.

Protocolo para determinar la concentración de O_2 disuelto en las soluciones

Reactivos

Agua de bajo contenido de O_2 : se hirvió el agua desmineralizada y destilada durante 20 minutos, se desgasificó en el baño ultrasónico Cleanson por 35 minutos y se la mantuvo en un frasco de vidrio cerrado hasta el momento de la determinación. Antes de ser usada fue saturada durante 20 minutos con N_2 gaseoso a la temperatura de interés. Se mantuvo el burbujeo de N_2 hasta finalizar el ensayo. El agua y la solución de interés se equilibraron con aire humidificado por burbujeo durante 20 minutos a la temperatura de interés.

Se determinó la concentración de O_2 en las soluciones de preservación/perfusión elegidas, luego de haberlas saturado con aire sintético medicinal.

Determinación del cociente de solubilidad q

Luego de calibrar el sensor de O_2 (Oxygen Probe 5331, Yellow Spring Instruments), una cámara de vidrio, que posee un volumen de 2,6 mL y se encuentra rodeada por una camisa de vidrio que es perfundida por un baño termostático con circulación, fue rellena con agua de bajo contenido de O_2 y se dejó estabilizar la señal leída por el monitor (Biological Oxygen Monitor 5300, Yellow Springs Instrument). Por medio de una jeringa se hizo un agregado de 300 μ L de agua equilibrada con aire a través de un orificio presente en el tapón de vidrio que sella la cámara; el líquido se inyectó en el

fondo de la misma. El volumen de las alícuotas es despreciable frente al volumen de agua de la cámara, por lo tanto, el volumen de líquido dentro de la misma puede considerarse constante durante las determinaciones. Se registró el incremento de la señal hasta que la misma se estabilizó nuevamente. Se vació la cámara y se repitió el procedimiento 4 veces.

Posteriormente, y de la misma manera en que se hizo para el agua, se realizó la misma serie de agregados utilizando la solución en estudio. A partir de los valores inicial y final para cada agregado, se calculó I_s e I_H usando las ecuaciones 13 y 14, respectivamente. El cociente de solubilidad q se calculó como el cociente I_s / I_H (ecuación 15).

Cálculo de la concentración de O_2

Una vez que se determinó el valor de q , la concentración de O_2 se calculó a partir de la ecuación 6, teniendo en cuenta la corrección por saturación con vapor de agua de la fase gaseosa con la que se equilibró la solución:

$$C_{O_2} = q \cdot C_{O_2}^{\circ} \cdot (B - p_w) / B$$

Ec. 16

Por lo tanto, para el cálculo de la concentración de O_2 debe conocerse, además del valor de q , la solubilidad $C_{O_2}^{\circ}$ del O_2 en agua pura, el valor de la presión barométrica B al momento de equilibrar el agua y la solución en estudio con aire, y la presión de vapor del agua (p_w) a la temperatura de trabajo. Se utilizaron los valores de presión barométrica informados por el Servicio Meteorológico Nacional ¹⁰⁹. $C_{O_2}^{\circ}$ y p_w son valores tabulados ¹¹⁰.

Se calculó la concentración de O_2 en la solución BGP-HMP a diferentes temperaturas (entre 1 y 35°C) y con estos valores se construyó una curva de solubilidad del O_2 en dicho medio.

Utilizando la siguiente ecuación se pudo linealizar la gráfica y, de esta forma, conocer el contenido de O_2 de la solución a cualquier temperatura por medio de una simple extrapolación.

$$\ln C_{O_2} = -\Delta H / RT + C'$$

Ec. 17

C_{O_2} : concentración de O_2 a la temperatura de trabajo.

T : temperatura (K).

R : constante de los gases (8,314 J/K.mol).

ΔH : calor de la solución (en kJ/mol).

C' : constante.

Consumo de O₂ del hígado durante la perfusión hipotérmica

Para poder determinar si la concentración de O₂ disuelto en la solución de preservación durante la perfusión hipotérmica es suficiente para suplir los requerimientos del hígado, se llevaron a cabo experimentos donde se determinó el consumo de oxígeno de hígados de ratas aislados y perfundidos a 5 y 10°C con las soluciones de preservación BGP-HMP o HTK saturadas con aire^{97,106}.

En la tabla 2 se muestran los resultados obtenidos:

Tabla 2: tasas de consumo de oxígeno de hígados de rata perfundidos con solución BGP-HMP o HTK a 5 y 10°C respectivamente. Los datos se expresan como la media \pm SD. Los hígados control fueron perfundidos a temperatura fisiológica con buffer Krebs-Henseleit oxigenado.

Solución	Temperatura (°C)	Consumo de Oxígeno (V _{O2}) (nmol O ₂ /min/g.hígado)
Hígados control Krebs Henseleit buffer (n = 3)	37.2 \pm 0.3	1150 \pm 10
HTK (n = 3)	10.8 \pm 0.6	57 \pm 4
	4.6 \pm 0.8	38 \pm 7
BGP-HMP (n = 4)	9.7 \pm 0.5	61 \pm 12
	5.1 \pm 0.2	33 \pm 5

Estudios sobre la presión oncótica o coloidosmótica de la solución BGP-HMP

Tal como se explicó anteriormente, la presión coloidosmótica del plasma es una forma de presión osmótica producida por las proteínas plasmáticas a nivel de las membranas capilares; la cual es importante en los fenómenos de distribución del agua entre la vasculatura y el espacio intersticial. Durante la perfusión hipotérmica, dado que es necesario mantener un nivel apropiado de fluido intravascular en presencia de una presión de perfusión más baja que la fisiológica, resulta importante considerar la inclusión de un coloide en la solución de perfusión hipotérmica y estudiar su efecto. A pesar de que casi nunca se citan datos que indiquen estudios en el tema a nivel de la preservación de órganos, nos debemos preguntar: ¿cuál es la COP óptima de una

solución de preservación para ser empleada en procedimientos de perfusión hipotérmica?

En el presente trabajo de tesis, la COP fue determinada utilizando un osmómetro coloidal u oncómetro a 20°C (Osmomat 050, Gonotec, Germany) con una membrana semipermeable de 20000 Daltons de corte (Figura 16). Es importante destacar que la condición óptima hubiera sido llevar a cabo las determinaciones a baja temperatura, pero aún no es posible porque no hay equipos comerciales disponibles.

Se determinaron los valores experimentales de COP para la solución de preservación BGP-HMP con el agregado de diferentes concentraciones de dos coloides diferentes: PEG 35K y almidón hidroxietilado (HES), utilizados a 1, 2, 5, 10 y 20 g/L a 20°C ¹¹¹.

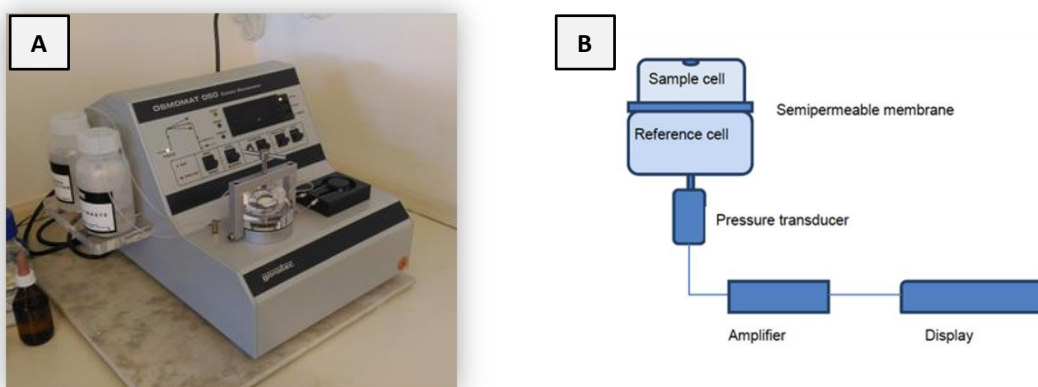


Figura 16. A) Oncómetro OSMOMAT (Gonotec) con membrana de 20.000 Daltons. **B)** Diagrama del equipo. La cámara inferior se llena con una solución salina isotónica libre de coloides y se conecta a un sensor de presión. En la cámara por arriba de la membrana semipermeable (a grandes moléculas) se coloca la muestra a medir. La fuerza coloideosmótica generada en la membrana provoca que el fluido se mueva desde la cámara inferior hacia la superior, creando una presión negativa (COP).

Estudios sobre la viscosidad (η) de la solución de preservación BGP-HMP

La viscosidad es una medida de la resistencia del flujo debido a la fricción interna de un fluido. Debido a esta característica fisicoquímica, es necesario aplicar una fuerza para provocar que una capa de fluido se mueva en relación con otra capa.

La temperatura es un factor que influye fuertemente sobre la viscosidad de un fluido. Por ejemplo, la viscosidad de la sangre a 4°C se duplica con relación a la medida a 37°C ⁸⁶. Además, la concentración del agente oncótico presente en la solución de preservación afecta en gran medida, no solo a la presión coloidosmótica, sino también a su viscosidad.

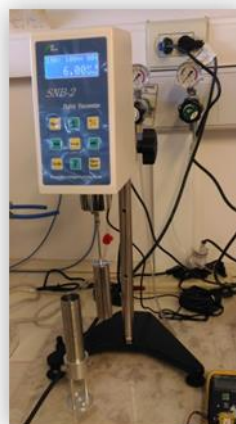
Para caracterizar la viscosidad de la solución de preservación y estudiar como se ve afectada por la adición de polímeros, en el presente trabajo de tesis se llevaron a cabo determinaciones mediante un viscosímetro digital del tipo rotativo (LCD Shanghai Nirun Intelligent Technology, modelo SNB-2) (Figura 17). Las mismas fueron realizadas sobre la solución de preservación BGP-HMP, pero con el agregado de diferentes

concentraciones del agente coloide PEG 35K y a diferentes temperaturas. De la misma forma que para las determinaciones de COP, en este caso también realizamos las de viscosidad reemplazando al agente coloide PEG 35K por almidón hidroxietilado (HES), a diferentes concentraciones y temperaturas.

Adicionalmente se realizaron determinaciones de viscosidad a diferentes temperaturas de otras soluciones de preservación (Viaspan, HTK y BGP-35) y H₂O destilada, para poder emplearlas como patrón y compararlas con nuestra solución BGP-HMP.

Figura 17. Viscosímetro rotacional con rotor #0.

Instrumento utilizado para realizar las determinaciones de viscosidad en diferentes soluciones de preservación.



SISTEMA DE PERFUSIÓN DE HÍGADO DE RATA AISLADO (IPRL)

La técnica de IPRL consiste en realizar una perfusión *ex vivo* en normotermia permitiendo evaluar la función y la integridad del hígado luego de la preservación hipotérmica. Este modelo se ha utilizado durante muchos años para investigar la fisiología y fisiopatología del hígado de rata, y tiene como principal ventaja permitir reproducir, con la mayor exactitud posible, las condiciones bajo las cuales se encuentra el órgano en el cuerpo del animal. Aunque es un enfoque limitado en comparación con el trasplante experimental, el modelo presenta algunas buenas razones para elegirlo: permite monitorear el daño celular y la función hepática durante todo el experimento, ausencia de alorreacciones, configuración controlada de los experimentos facilitando la reproducción de manera confiable, etc. Además, permite una reducción significativa en el uso de recursos de laboratorio y animales, ya que evita realizar procedimientos invasivos en otro animal de laboratorio ^{112,113}.

En la figura 18 se esquematiza el sistema de IPRL con todas sus partes. Una vez que el hígado es retirado del medio de preservación es situado en el soporte del sistema para dar comienzo a una perfusión de estabilización con buffer Krebs-Henseleit de aproximadamente 15 minutos en un circuito no recirculante. Algunos parámetros como la presión portal, la temperatura y el pH son llevados gradualmente hacia la condición fisiológica: 100-140 mmH₂O de presión hidrostática, 37°C y pH=7.40. Posteriormente, una vez que el hígado se encuentra hemodinámicamente estable y el mismo comienza a producir bilis, el medio de perfusión se reemplaza por

Krebs-Henseleit+Dextrán (2%) constantemente oxigenado a través de un oxigenador tipo Hamilton presurizado (atmósfera de Carbógeno 90-120 mmHg). A partir de ese momento, los hígados son reperfundidos durante 90 min en un circuito cerrado con una presión portal constante, regulada a través de una bomba de perfusión peristáltica. Una solución de taurocolato de sodio 300 μM es inyectada al medio de perfusión, a una velocidad de 0,2 mL/min, a lo largo del experimento con el fin de sostener la producción biliar. La temperatura del órgano es mantenida a 37°C con una lámpara infrarroja, al mismo tiempo que el perfusato es mantenido a temperatura por la acción de un baño que hace recircular agua por una camisa de intercambio de calor. Periódicamente se toman muestras del perfusato para analizar parámetros de integridad y funcionalidad celular (ej. liberación de enzimas citosólicas, consumo de oxígeno, producción de urea). Además, se determina la velocidad de secreción de bilis y se registran los cambios en el flujo de perfusión con los cuales se calcula el grado de resistencia intrahepática.

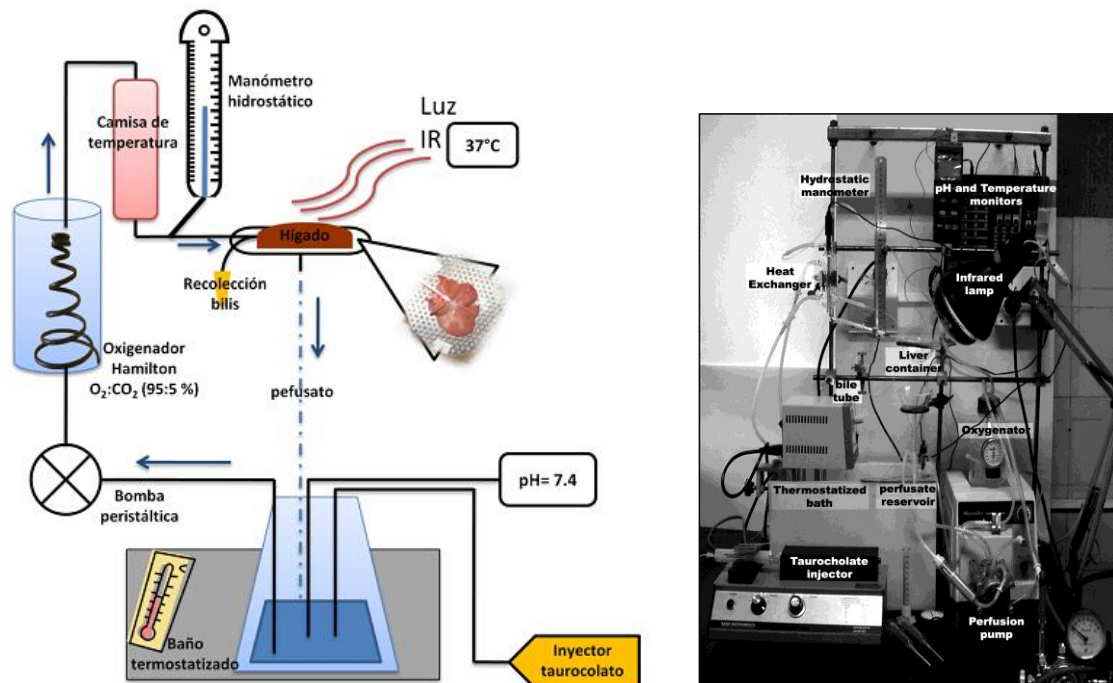


Figura 18. Sistema de perfusión de hígado de rata aislado (IPRL).

Esquema del circuito con sus componentes (las flechas azules indican el sentido de la perfusión) y fotografía del equipo.

Parámetros estudiados durante la reperfusión normotérmica

Resistencia intrahepática (RI)

El sistema IPRL puede funcionar a presión o flujo controlados, según cual es el parámetro que se mantendrá constante y cual varía según la respuesta del órgano. En los experimentos abordados en la presente tesis, la presión de perfusión fue mantenida constante y cercana a los 8 mmHg. El flujo de perfusión resultó ser una

variable sujeta a la resistencia intrahepática, evitando así el daño extensivo a las células endoteliales. El parámetro resistencia intrahepática constituye un reflejo del estado de la microvasculatura del hígado: la resistencia aumenta en respuesta a la vasoconstricción y obstrucciones producto de la injuria por isquemia/reperfusión en células endoteliales de los sinusoides ¹¹³.

La RI se calculó a través del flujo portal de perfusión (FP), el cual fue determinado cada 15 min con un cronómetro y midiendo el volumen de fluido en una probeta:

$$RI \text{ (mmHg.min.g hig.mL}^{-1}\text{)} = \text{presión portal (mmHg)} / FP \text{ (mL.min}^{-1}\text{.g hig}^{-1}\text{)}$$

Producción de bilis (PB)

Una producción biliar apropiada durante la perfusión normotérmica de un hígado aislado indica que el órgano conserva en buen estado la red de conductillos biliares que nacen entre los hepatocitos y desembocan en el colédoco. Además, el hecho de mantener activo el metabolismo biliar, da cuenta que el hígado aún conserva las reservas energéticas que se requieren para el transporte activo de sales biliares a través de la membrana de los hepatocitos.

La bilis fue recolectada en tubos Eppendorf con una frecuencia de 15 min, y el volumen producido se estimó gravimétricamente asumiendo una densidad igual a la del agua (1 g/mL).

$$PB \text{ (}\mu\text{L.min}^{-1}\text{.g hig}^{-1}\text{)} = \mu\text{L de bilis}/(15 \text{ min.g hig})$$

Consumo de oxígeno (ConsO₂)

La capacidad para captar O₂ del medio de perfusión es, en primera instancia, un indicador de viabilidad celular ya que sólo las células vivas pueden consumir O₂. Además, es una medida que brinda información acerca del estado metabólico del hígado y del funcionamiento de las mitocondrias.

Para calcular el consumo de oxígeno se utilizó un dispositivo sensor de oxígeno (Biological Oxygen Monitor 5300) el cual se encuentra equipado con una sonda para oxígeno (YSI 5331, Yellow Springs, Ohio, USA). Las mediciones se llevaron a cabo en muestras de perfusato tomadas previo a la entrada al hígado y en la salida del mismo cada 30 min.

$$ConsO_2 \text{ (}\mu\text{mol O}_2\text{.min}^{-1}\text{.g hig}^{-1}\text{)} = (C_e - C_s) \cdot FP \text{ (mL.min}^{-1}\text{.g hig}^{-1}\text{)}$$

Con C_e y C_s como las concentraciones de oxígeno en el perfusato al entrar al hígado y al salir de él respectivamente.

$$C_e/s \text{ (}\mu\text{mol O}_2\text{.mL}^{-1}\text{)} = pO_2 \text{ (kPa)} \cdot SO_2 \text{ a } 37^\circ\text{C} \text{ (0,01056 } \mu\text{mol O}_2\text{.mL}^{-1}\text{.kPa}^{-1}\text{)}$$

Se calculó la pO_2 asociada conociendo la presión atmosférica del día en que se llevó a cabo el experimento (<https://www.smn.gob.ar>), según los cálculos de Gnaiger ¹¹⁴.

Síntesis de urea

La síntesis de urea en el hígado es la principal ruta de eliminación del nitrógeno del organismo. Las enzimas del ciclo de la urea comienzan a disminuir su actividad cuando el hígado entra en disfunción por alguna patología, por lo tanto, este parámetro es un buen indicador de funcionalidad metabólica del hígado ¹¹⁵.

La concentración de urea en el perfusato fue determinada cada 30 min mediante una técnica colorimétrica con diacetil monoxima ^{116,117}. A continuación se detalla brevemente la misma: las muestras de perfusato fueron desproteinizadas con ácido perclórico (5%), centrifugadas 3 min a 14000 g e incubadas durante 10 minutos a 100°C con el reactivo de trabajo para urea (ver soluciones y buffers, página 69). Luego, se leyó absorbancia a $\lambda = 525$ nm utilizando una curva de calibración Urea vs. ABS_{525} (50-1000 μM) para obtener la concentración en la muestra. Los resultados se expresaron en $\mu moles\ urea.min^{-1}.g\ hig^{-1}$.

Liberación de enzimas intracelulares (LDH, AST y ALT)

Los hepatocitos constituyen cerca del 70% de la masa total del hígado, por lo tanto, cuando se generan daños en la membrana plasmática o ruptura celular, las enzimas hepatocelulares se liberan y su actividad puede ser fácilmente detectada en el medio de perfusión. Aunque la aspartato transaminasa (AST) no es una enzima específica del hígado, es un buen marcador de daño en el IPRL. AST se encuentra tanto en el citoplasma como en las mitocondrias, y su incremento en el perfusato significa que existe un daño severo ($AST/ALT > 1$). La enzima alanina transaminasa (ALT) se localiza mayormente en citoplasma y su liberación se produce incluso ante injurias leves ($AST/ALT < 1$). La enzima lactato deshidrogenasa (LDH) se localiza en el citoplasma de los hepatocitos y de células no parenquimatosas del hígado, por lo cual constituye un buen marcador general de daño en el tejido ¹¹².

La liberación de las enzimas ALT y AST se determinó con kits comerciales (Método UV optimizado, Wiener Lab). Muestras de perfusato tomadas a los 0, 30, 60 y 90 min de perfusión normotérmica fueron incubadas con el reactivo según las instrucciones del fabricante y se siguió la cinética de desaparición del NADH durante 3 minutos (lecturas cada 45 segundos) a $\lambda = 340$ nm y 37°C.

La actividad de la enzima LDH se determinó con un kit elaborado en el laboratorio (ver soluciones y buffers, página 69) y se procedió de la misma forma que con las otras dos enzimas.

La pendiente de la curva ABS vs tiempo ($\Delta Abs/min$) se utilizó para el cálculo de la concentración enzimática:

$$[\text{enzima}] \text{ U/L} = (\Delta \text{Abs/min}) \cdot V / (b \cdot \epsilon^{\text{NADH}} \cdot v)$$

V, v = volumen de reacción, volumen de muestra.

b = paso óptico (1 cm)

$\epsilon^{\text{NADH}} = 6220 \text{ L. moles}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$

Contenido de glucógeno

Durante el período de preservación hipotérmica y reperfusión del órgano, las reservas hepáticas de glucógeno son importantes como fuente de ATP ¹¹⁸. Aquellos hígados que mantengan sus depósitos de glucógeno, cuentan con una importante fuente de energía para enfrentar los daños asociados a la isquemia/reperfusión.

Luego de finalizar los 90 min de reperfusión normotérmica, se tomaron muestras de tejido de los hígados para llevar a cabo la determinación de glucógeno; las mismas fueron almacenadas a -20°C hasta el momento de su empleo. Las determinaciones fueron realizadas según la técnica descrita por Carr S y col ¹¹⁹: las porciones de tejido se disgregaron en buffer citrato (0,1 M, pH=5,00) utilizando la herramienta Ultraturax®. El extracto hepático fue alícuotado en 2 fracciones y se efectuó una inactivación enzimática por calentamiento a 100°C. Una de las alícuotas fue tratada con la enzima α -amiloglucosidasa (0,5% α -amiloglucosidasa en buffer citrato) por 2 horas en un baño a 55°C, la otra fue utilizada como blanco de la reacción de digestión del glucógeno. Finalmente, las muestras fueron centrifugadas durante 5 min a 14000 g y se determinó el contenido de glucosa libre (proveniente de la digestión del glucógeno) en el sobrenadante con un kit de glicemia enzimática AA Wiener Lab.

Para el cálculo del contenido de glucógeno se construyeron dos curvas de calibración:

$$1) \text{ Glucosa (glu) vs. ABS}_{505} (5\text{-}40 \mu\text{g}) \rightarrow \text{ABS}_{505} = m_1 \cdot \mu\text{g glu} + y_1$$

$$2) \text{ Glucógeno (gno) vs. ABS}_{505} (5\text{-}40 \mu\text{g}) \rightarrow \text{ABS}_{505} = m_2 \cdot \mu\text{g gno} + y_2$$

$$\text{Glucógeno (mg/g hig)} = R_m \cdot (\text{mg glucosa/g hig})$$

$$R_m = m_1/m_2 = \mu\text{g gno}/\mu\text{g glu}$$

Estudios histológicos

Para llevar a cabo el análisis histológico, luego de la reperfusión *ex vivo* en el IPRL, se utilizó la tinción de Hematoxilina/Eosina. La misma se llevó a cabo con el objetivo de estudiar la integridad morfológica del parénquima hepático.

Se tomaron biopsias de alrededor de 5 mm de espesor de todos los grupos experimentales y se fijaron en una solución de formaldehído al 10% en PBS. Posteriormente se procedió a deshidratarlas y embeberlas en parafina, para luego generar secciones de 5 μm que se montaron en portaobjetos para la tinción.

El método de tinción consiste en una fase inicial de coloración de los núcleos en color violáceo, con hematoxilina; y una segunda fase de contraste citoplasmático y

componentes extracelulares en tonalidades rosadas, con eosina. Las observaciones fueron semi-cuantificadas, y para ello se examinaron, mediante microscopía de campo claro, al menos 30 campos elegidos al azar de 3 biopsias fijadas para cada grupo experimental. Las imágenes tomadas (objetivo 40X) se procesaron con el programa de computación ImageJ (NIH, Maryland, USA), el cual permite la superposición de grillas de 80 puntos sobre la imagen, facilitando la contabilización de los siguientes signos de injuria que comúnmente se hallan en la histología de hígados que han sido sometidos a períodos de isquemia/reperfusión ¹²⁰:

- **Dilatación sinusoidal:** ensanchamiento del espacio delimitado por dos cordones hepatocitarios, producto de la alteración en la microcirculación.
- **Vacuolización:** presencia de vacuolas intracitoplasmáticas, signo primario de la extensión del daño hepatocelular o de muerte celular.
- **Células endoteliales sueltas:** redondeo y ausencia de adhesión de las células endoteliales que conforman el revestimiento de los sinusoides, como consecuencia de la pérdida de viabilidad y de alteraciones en la microcirculación.

TRASPLANTE HEPÁTICO EXPERIMENTAL

Cirugía y diseño experimental

El modelo utilizado fue el de trasplante hepático heterotópico auxiliar y reducido de rata con arterialización de la vena porta, utilizando una técnica previamente descrita ¹²¹⁻¹²³.

De la misma forma que para los estudios *in vitro*, para los trasplantes también se emplearon machos adultos de rata Sprague Dawley y los mismos no recibieron ayuno previo a la cirugía. Se anestesiaron con isofluorano, durante la inducción (5%) y el mantenimiento (1-3%). El tramadol (10 mg/kg peso) vía subcutánea fue escogido para una apropiada analgesia en el prequirúrgico y durante los tres primeros días del post operatorio.

Todas las cirugías de trasplante hepático fueron llevadas a cabo en la Cátedra de Trasplante de la Facultad de Ciencias Médicas de la Universidad Nacional de La Plata (FCM-UNLP), en el marco de una colaboración con el Hospital Universitario Fundación Favaloro y la Universidad Favaloro.

Cirugía en el donante

Se realizó un abordaje xifopúbico ampliando la exposición del hígado donante con prolongación de las incisiones hacia ambos flancos. Posteriormente se separó el hígado de todos los ligamentos de unión en sentido de las agujas del reloj, se identificaron y coagularon todos los vasos esofágicos. Para visualizar mejor los vasos se traccionó el estómago hacia distal, fuera de la cavidad abdominal. Se colocó un stent en el conducto biliar con un catéter 24G (longitud de 0,7 cm). A continuación se ligó la parte

distal del conducto para que se ingurgite (seda 7-0). El catéter fue colocado luego de hacer un ojal y se fijó al conducto con seda 6-0.

La vena porta es disecada separando la arteria hepática común y ligando la arteria hepática propiamente dicha. El páncreas es separado y la vena pilórica cauterizada. Se debe colocar un reparo distal con seda 6-0. En este momento se comienza a preparar la vena cava infrahepática y se separa el lóbulo triangular hepático para levantarlo con una gasa húmeda y exponer el riñón derecho.

La preparación de la vena cava infrahepática comienza con la cauterización de la arteria renal derecha cerca de su origen. Acto seguido, y pasando por debajo de la vena cava infrahepática, se liga la vena renal derecha en su origen. Posteriormente se ligan en masa la arteria y vena renal derecha a nivel del hilio renal para extraer el riñón derecho y aumentar la longitud de la vena cava infrahepática. Seguidamente, se ligan los vasos adrenales por debajo de la vena cava infrahepática y la misma se repara (seda 6-0) proximal al origen de la vena renal izquierda.

Se administran 3 mL de solución fisiológica tibia heparinizada vía endovenosa. El reparo en la vena porta es ajustado y posteriormente se sujeta el reparo en vena cava infrahepática. Es en esta parte de la cirugía cuando se procede con el lavado del hígado; se hace un ojal en vena porta y se lava con 5 ml de solución fría utilizando un catéter 18G. Es importante asegurar una correcta posición del hígado para poder realizar un lavado uniforme, las áreas moteadas sin lavado serán zonas mal reperfundidas en el receptor. A continuación se seccionan la vena cava infrahepática y la vena cava suprahepática para liberar la presión del lavado. Se corta la vena porta y se retira el injerto.

En la figura 19 pueden visualizarse imágenes de la técnica de trasplante heterotópico. La microcirugía se lleva a cabo bajo un microscopio estereoscópico (Zeiss, Germany).



Figura 19. Trasplante hepático heterotópico auxiliar y reducido de rata.

Cirugía de banco

Se posiciona el hígado identificando los lóbulos y se realiza una ligadura de modo tal que descartemos el 70% del hígado y reservemos el 30% para ser implantado. Posteriormente se identifica la vena cava suprahepática para colocar un catéter para extracción de sangre a los 30 minutos de la reperusión (Figura 20).

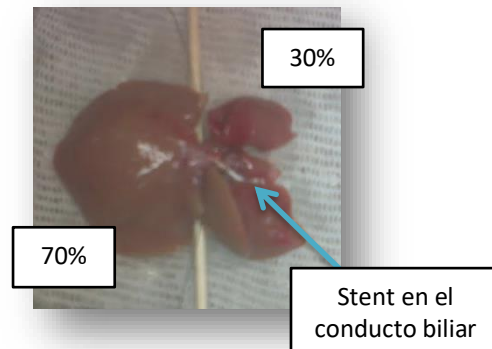


Figura 20. Fragmentación del hígado durante la cirugía de banco. 30% del hígado donante es implantado.

Cirugía en el receptor

Se realizó un abordaje xifopúbico y se disecó el riñón derecho para poder canular la arteria renal con un catéter siliconado y heparinizado neonatal de 0.3 mm de diámetro y de 0.7 mm de longitud. La arteria renal se mantiene clampeada en su origen y la vena renal es ligada también en su origen; luego se coloca una ligadura en masa en la arteria y vena renal para extraer el riñón derecho.

Los vasos abdominales son clampeados inmediatamente distal al origen de los vasos renales izquierdos; luego se procede a realizar un ojal en la vena cava abdominal y se inicia la anastomosis término-terminal entre las venas cavas infrahepática del donante y del receptor respectivamente.

A continuación se inserta la cánula siliconada colocada en la arteria renal para conectarla en continuidad con la vena porta del donante. En este punto comienza la revascularización del injerto al liberar inicialmente el clamp distal y luego el proximal que fueron colocados en los vasos abdominales, por último se retira el clamp micro bulldog que oblitera la arteria renal (Figura 21).

Evaluación del daño sufrido por el injerto y lesión celular en el modelo de trasplante hepático heterotópico

- Se recogieron muestras de sangre de la vena cava inferior, 24 h después de la reperusión en cada grupo estudiado. Los niveles de alanina aminotransferasa (ALT) se analizaron con un kit comercial (Wiener lab, Argentina).

- Biopsias del injerto de hígado también se recogieron 24 h después de la cirugía. Las mismas se fijaron con solución de formaldehído al 10%, se embebieron en parafina, fueron teñidas con Hematoxilina/Eosina y se observaron con un microscopio óptico.

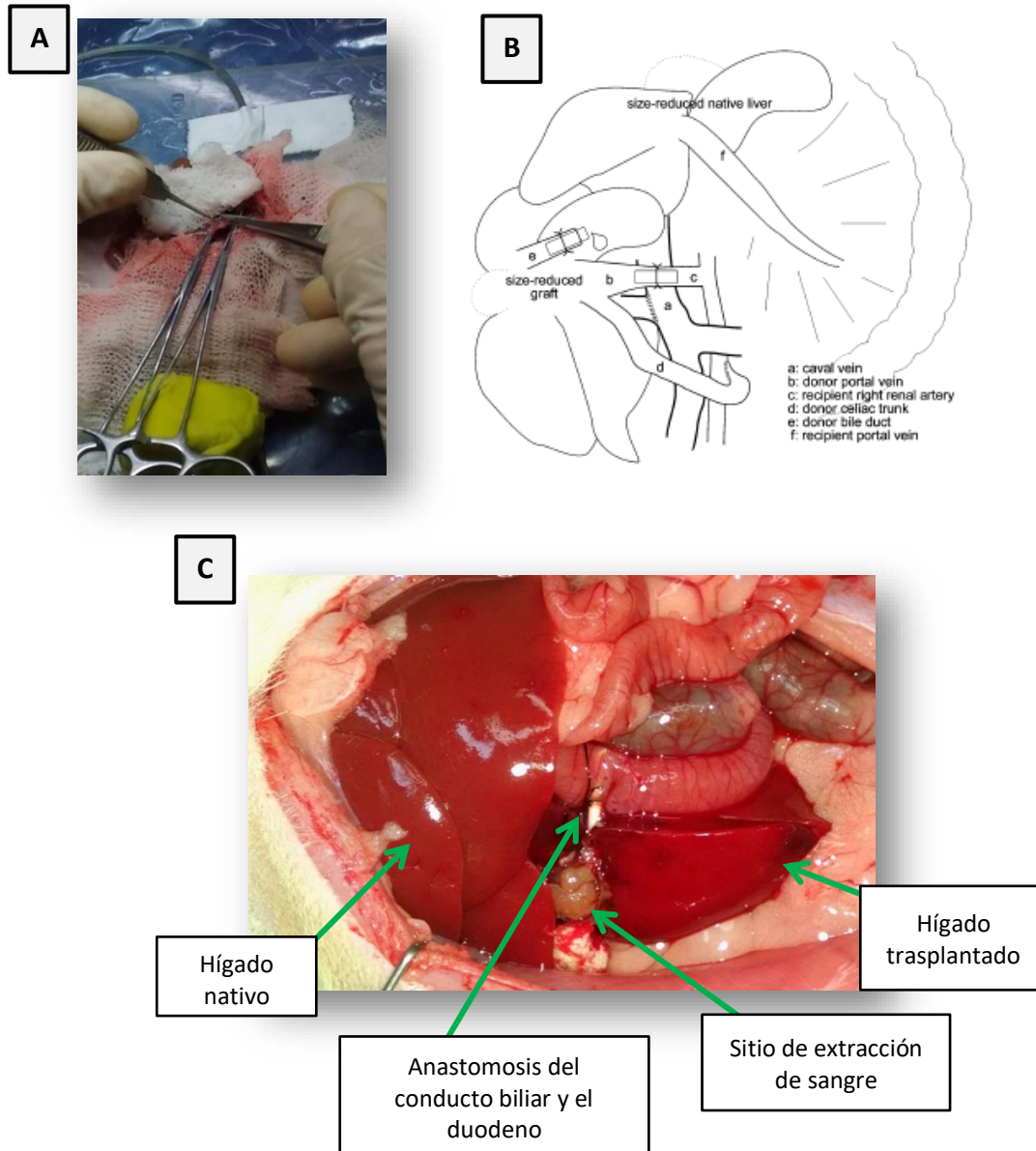


Figura 21. Trasplante hepático heterotópico auxiliar y reducido de rata, cirugía en el receptor. A) Fotografía tomada durante la cirugía. **B)** Diagrama ilustrativo de las anastomosis realizadas para injertar el hígado preservado, extraído de Schleimer, K. *et al.* 2006. **C)** Trasplante realizado durante el presente trabajo de tesis.

La cuantificación del daño hepático se determinó utilizando un sistema de clasificación informado por Camargo et al ¹²⁴ y modificado por Abu Amara et al ¹²⁵. Se consideraron siete parámetros para cada muestra analizada: 1) hemorragia; 2) infiltración de neutrófilos; 3) necrosis celular; 4) cambios eosinófilos de los hepatocitos; 5) hepatocitos sin cohesión; 6) vacuolización citoplásmica; y 7) dilatación

sinusoidal. Cada parámetro se calificó (0, normal; 1, cambio leve; 2, cambio moderado; y 3, cambio grave) (Tabla 3). Cada muestra recibió una puntuación general resultante de agregar cada parámetro evaluado.

Tabla 3. Escala de Abu Amara et al utilizada para cuantificar el daño hepático generado luego de reperfundir los hígados preservados y trasplantados.

Valor	Hemorragia	Infiltración neutrofílica	Necrosis celular	Cambios eosinofílicos en hepatocitos	Hepatocitos sin cohesión	Vacuolización citoplasmática	Dilatación sinusoidal
0	Ausencia	Ausencia	Ausencia	Ausencia	Ausencia	Ausencia	Ausencia
1	Leve	Leve	Leve	Leve	Moderado	Leve	Leve
2	Frecuente perivenular	Dispersa en algunos lóbulos	Moderada	Dispersa en algunos lóbulos	Focal	Dispersa en algunos lóbulos	Frecuente perivenular
3	Frecuente perivenular (perizonal - mediozonal)	Dispersa en mayoría de lóbulos	Múltiples áreas confluentes buenos necrosis	Dispersa en mayoría de lóbulos	Multifocal	Dispersa en mayoría de lóbulos	Frecuente perivenular mediozonal
4	Panlobular	Extendida	Severa parénquima viable nulo	Extendido	Extendido (severo)	Extendida (severa)	Panlobular

SOLUCIONES Y BUFFERS

- **Krebs-Henseleit (KH):** este buffer es de uso estándar para la perfusión de hígado aislado ¹¹². En los experimentos realizados para la presente tesis se utilizó para perfundir a los hígados durante la cirugía y en la etapa de estabilización durante la reperfundición normotérmica. En la tabla 4 se detalla su composición.

Componente	Concentración (mM)
NaCl	118,00
KCl	4,80
KPO ₄ H ₂	1,20
CaCl ₂	1,50
MgSO ₄	1,20
NaCO ₃ H	25,0
Glucosa	5,00
Heparina	2,00 UI/mL
Saturación con carbógeno (O ₂ :CO ₂ , 95:5%) durante 20 minutos	
Osmolalidad: 300-310 mOsm/Kg H ₂ O	
pH final = 7,40	

Tabla 4. Composición química del buffer Krebs-Henseleit. Se utilizó durante el lavado de los hígados procurados y como perfusato durante la técnica de IPRL.

- **Krebs-Henseleit + Dextrán (KHD):** fue utilizado como perfusato durante la perfusión de los hígados en el sistema IPRL. El dextrán (PM promedio 64-74 kDa) al 2% proporciona las propiedades osmóticas coloidales adecuadas.
- **Reactivo de trabajo para urea:** dos partes de la sol. 1 + 1 parte de la sol. 2.
 - Sol. 1: 10% H_3PO_4 , 30% H_2SO_4 , 0,37 mM $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$.
 - Sol. 2: 0,5% diacetil monoxima, 0,01% tiosemicarbazida.
- **Kit para actividad LDH:**
 - 50 mM fosfato de potasio + 0,63 mM piruvato de Na, pH = 7,50
 - Solución NADH 13,1 mM: 0,3 M NADH + 1,2 M NaHCO_3

ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los resultados fueron analizados con el programa GraphPad Prism 5.04 (GraphPad Software, La Jolla California USA). Con esta herramienta informática se realizaron los test estadísticos de análisis de la variancia (ANOVA) para las muestras que cumpliesen el supuesto de distribución normal e igualdad de variancias, en caso contrario se aplicó un test no paramétrico como el de Kruskal-Wallis. Las comparaciones múltiples se realizaron a través del test de Bonferroni y de Tukey. Se consideró que a una $p < 0,05$ existió diferencia estadísticamente significativa. Los datos se expresaron como la media de las observaciones \pm la desviación estándar (SD). El número de observaciones es indicada en cada caso: $n = 5$.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

“La alegría y gratitud de los trasplantados es el motivo de que habitualmente comiencen a contar su edad a partir de la fecha del trasplante. Su segundo nacimiento. Y lo celebran como su principal cumpleaños. Esas actitudes hacen posible cambiar un aniversario penoso para una familia, en una fecha de celebración y alegría para otra.

Fragmentos extraídos del libro: “En memoria de nuestros donantes”
Dr. Miguel Ángel de Frutos Sanz.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

CARACTERIZACIÓN FÍSICOQUÍMICA DE LA SOLUCIÓN DE PRESERVACIÓN BGP-HMP

El éxito de los trasplantes depende de múltiples variables: la condición base de los pacientes, la técnica quirúrgica, los tratamientos inmunosupresores y por último pero no menos importante, una preservación adecuada del órgano a ser implantado. Con relación al último punto, la composición y características de la solución de preservación son fundamentales. La solución nos permitirá controlar bioquímicamente los cambios que se llevan a cabo durante el período de isquemia fría y poder mantener la viabilidad del órgano hasta el momento de su implantación.

Las dos técnicas de preservación de órganos, HMP y SCS, requieren de soluciones de preservación adecuadas. Las soluciones poseen diferentes componentes, pero todas contienen cuatro constituyentes esenciales: una adecuada concentración de electrolitos (altos o bajos índices de Na^+/K^+), un buffer para prevenir la acidosis, un agente impermeante para prevenir el hinchamiento celular, y un coloide para minimizar el edema intersticial dado por la difusión a partir de la solución de preservación.

Como se explicó anteriormente, hasta el momento aún se tienen dudas sobre cuál es la solución de preservación idónea para ser utilizada mediante la técnica de perfusión hipotérmica. Tampoco se tiene claro si es necesaria la suplementación de la misma con oxígeno y su rol durante la preservación hipotérmica. Por estas razones, en nuestro laboratorio hemos desarrollado una solución de preservación propia, basada en los componentes fundamentales BES-Gluconato-Polietileneglicol (BGP-HMP). En este apartado de la tesis se detallan los resultados obtenidos de la caracterización físicoquímica de la misma.

Determinación de la capacidad buffer

Se determinó la capacidad buffer de la solución BGP-HMP a 5 y 10°C, y la misma fue comparada con la medida para la solución Custodiol® como referencia. La metodología empleada se describe en el capítulo de materiales y métodos, página 48.

Los resultados se muestran en la figura 22.

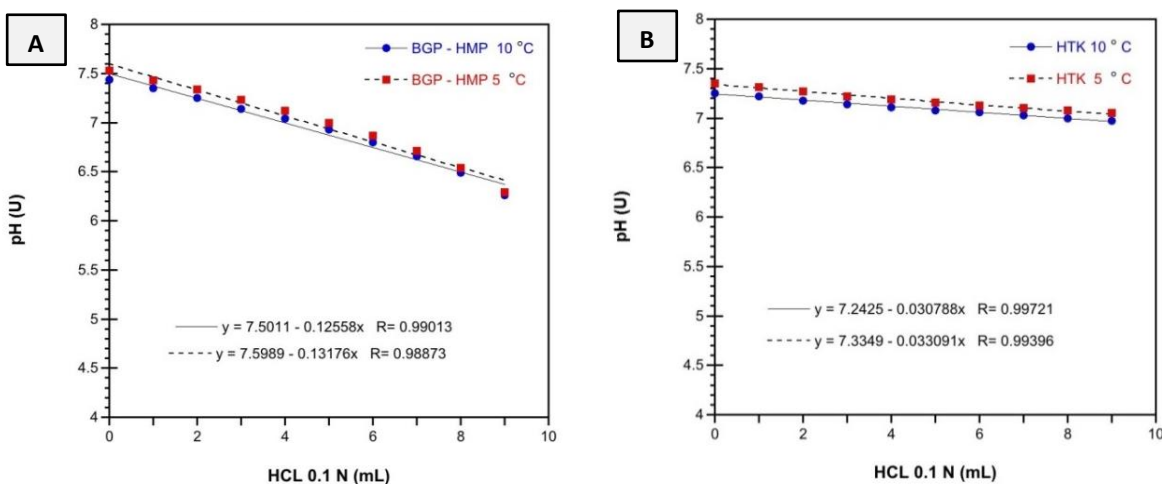


Figura 22. A) Curvas de titulación a 5 y 10°C de 50 mL de la solución de preservación BGP-HMP. **B)** Curvas de titulación a 5 y 10°C de 50 mL de la solución de preservación Custodiol®. En ambos casos fueron titulados con HCl 0,1 N. Se registró el pH obtenido después de la adición de alícuotas de 1mL de HCl.

Los valores de capacidad buffer calculados a partir de la ecuación 2 se muestran en la tabla 5:

Tabla 5. Capacidad buffer estudiada para ambas soluciones de preservación a 5 y 10°C.

	BGP (mEq H ⁺ / UpH/L Sol.)	Custodiol® (mEq H ⁺ / UpH/L Sol.)
5°C	15	59
10°C	15	63

Como puede observarse en la tabla, la capacidad buffer calculada para nuestra solución de preservación BGP-HMP es menor que la calculada para la solución Custodiol® (15.44 vs. 59 mEqH⁺/UpH/L sol. respectivamente). De todas formas, la capacidad buffer fue suficiente para mantener el pH de la solución durante 24 horas de perfusión hipotérmica. Cabe destacar que la solución Custodiol® fue diseñada para preservación estática, condición para la cual se requiere poseer una capacidad buffer lo suficientemente alta como para atenuar o evitar el importante descenso de pH intracelular que acontece como consecuencia de la glicolisis en condiciones de anaerobiosis.

Determinación del punto de congelamiento

Punto de congelamiento experimental:

Una condición sumamente importante que debe reunir una solución de preservación consiste en que pueda mantener a todos los fluidos celulares y compartimentos en estado líquido a la temperatura de preservación, evitando la formación de hielo y la subsecuente ruptura de las estructuras celulares.

En la figura 23 se muestran las curvas de descenso de temperatura en función del tiempo de la solución BGP-HMP y del agua destilada respectivamente. Cada determinación se realizó por cuadruplicado y el valor de los puntos de congelamiento se calculó como el promedio de temperatura en la meseta de la curva. La solución BGP-HMP presentó un punto de congelamiento de $-0,55 \pm 0,05^{\circ}\text{C}$. Para el caso del agua destilada su valor coincidió con el valor teórico de 0°C en todas las determinaciones.

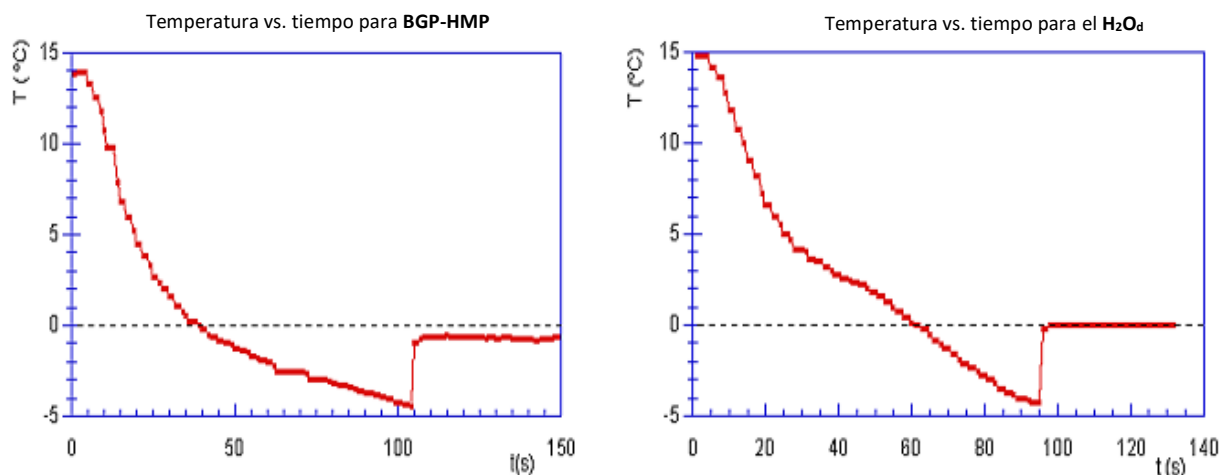


Figura 23. Historia térmica de la solución de preservación vs H₂O_a.

Curvas de descenso de la temperatura (°C) en función del tiempo (segundos) de la solución BGP-HMP y del agua (n = 4).

Punto de congelamiento teórico:

Empleando la ecuación 5 obtuvimos el punto de congelamiento teórico de la solución BGP-HMP;

$$T_{C \text{ Sol. BGP-HMP}} = -0,55^{\circ}\text{C}$$

El valor teórico del punto de congelamiento de la solución BGP-HMP coincidió con el valor experimental del mismo. Teniendo en cuenta que los valores de punto de congelamiento del agua y de la solución BGP-HMP coincidieron con sus valores teóricos, podemos afirmar que el método desarrollado para determinar este parámetro de nuestra solución es un método confiable.

Teniendo en cuenta que nuestros protocolos experimentales de preservación hepática son desarrollados a 5 y 10°C, podemos concluir que habiéndose determinado un punto de congelamiento de -0.55°C para nuestra solución, no hay riesgo de que se congelen los tejidos a esas temperaturas.

Determinación voltamperométrica de la concentración de O₂ disuelto en la solución de preservación/perfusión BGP-HMP

Con el afán de abordar uno de los interrogantes que existen en torno a la preservación dinámica y a la composición de la solución ideal para ser utilizada con esta técnica, decidimos trabajar sobre la extracción de oxígeno por los hígados durante la preservación y la solubilidad del mismo en nuestra solución de preservación BGP-HMP.

Para poder obtener los valores absolutos del consumo de O₂ de hígados en hipotermia y así determinar si resultaba necesario suministrar oxígeno suplementario

a la solución de preservación, fue necesario determinar la concentración de O₂ disuelta en la misma.

Se utilizó el método de Rasmussen y Rasmussen modificado, y se determinó la concentración de O₂ disuelto en la solución BGP-HMP equilibrada con aire, a distintas temperaturas entre 1 y 35°C. Dicha concentración fue graficada en función de la temperatura del sistema; las curvas de solubilidad resultantes se muestran en la figura 24. En cada gráfica se expone, además, la curva de solubilidad del O₂ en agua (determinada por el mismo método). La solubilidad del O₂ en la solución de preservación y en agua se linealizó a través de la ecuación 17, para poder conocer la concentración de O₂ a la temperatura de trabajo, por medio de una simple extrapolación.

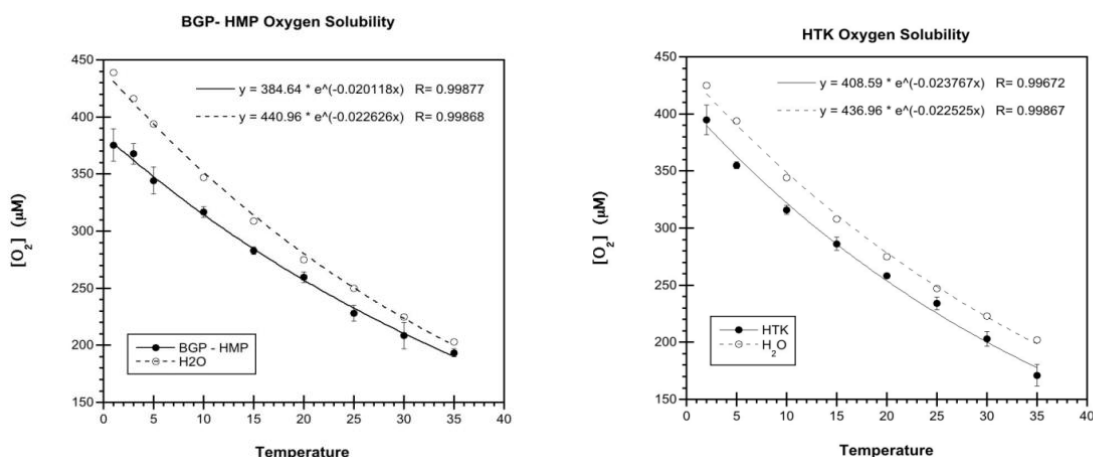


Figura 24. Curvas de solubilidad del O₂ en las soluciones BGP-HMP, HTK y en agua. Las curvas de solubilidad fueron realizadas a una presión atmosférica de 758,01 mmHg. Cada valor representa el promedio \pm SD de 3 mediciones.

760 mmHg	5°C	10°C
BGP-HMP	351	314
HTK	370	325

Las concentraciones de O₂ obtenidas fueron corregidas por la presión barométrica del día de trabajo y con estos valores construimos la tabla 6¹⁰⁶ que permite conocer la cantidad de O₂ disuelto en la solución BGP-HMP en el rango de temperatura de 0 a 35°C, y para un rango de presión de 735 a 785 mmHg. En base a los resultados, la solubilidad del O₂ en la solución BGP-HMP a 5 y 10°C (760 mmHg) fue de 351 y 314 μM respectivamente.

Debido a que la solución de preservación diseñada es una mezcla compleja de agentes osmóticamente activos y otros solutos, la solubilidad de O₂ en dicha solución, tal como se esperaba, es menor que en agua pura debido a interacciones entre las especies moleculares en la solución.

Tal como se presentó en la tabla 2 de la sección materiales y métodos, los hígados perfundidos en hipotermia consumen menos cantidad de oxígeno a 5°C que a 10°C, lo que estaría directamente asociado al efecto de la temperatura sobre las actividades metabólicas del tejido. Nuestros estudios muestran, además, que los hígados perfundidos a bajas temperaturas presentaron una actividad respiratoria menor al 5% del valor obtenido trabajando a 37°C con el modelo de hígado aislado (control a 37°C, 1150 ± 10 ; BGP-HMP 10°C, 61 ± 12 ; BGP-HMP 5°C, 33 ± 5 nmol O₂/min/g.hígado). Este

último hecho es importante ya que, considerando que las solubilidades del O₂ medidas en la solución BGP-HMP a 5 y 10°C fueron de 351 y 314 µM respectivamente, evidencia que no es necesario perfundir el tejido con altas concentraciones de O₂ a bajas temperaturas, ya que a esas temperaturas los hígados consumen menos oxígeno del que dispone la solución de manera soluble. Elegimos simplemente mantener el tenor de oxígeno de la solución por medio de un aireador de pecera durante la preservación por perfusión hipotérmica.

Tabla 6. Solubilidad de oxígeno en solución BGP-HMP (µM) en función de la temperatura y la presión barométrica (mmHg).

T (°C)	Presión barométrica (mmHg)										
	735	740	745	750	755	760	765	770	775	780	785
0	379.42	382.00	384.58	387.16	389.74	392.32	394.91	397.49	400.07	402.65	405.23
1	370.83	373.36	375.88	378.40	380.92	383.45	385.97	388.49	391.01	393.54	396.06
2	362.50	364.97	367.43	369.90	372.36	374.83	377.30	379.76	382.23	384.69	387.16
3	354.41	356.83	359.24	361.65	364.06	366.47	368.88	371.29	373.70	376.11	378.52
4	346.56	348.92	351.28	353.64	356.00	358.35	360.71	363.07	365.43	367.78	370.14
5	338.94	341.25	343.56	345.86	348.17	350.47	352.78	355.08	357.39	359.70	362.00
6	331.54	333.80	336.05	338.31	340.56	342.82	345.08	347.33	349.59	351.84	354.10
7	324.35	326.56	328.77	330.97	333.18	335.39	337.59	339.80	342.01	344.21	346.42
8	317.37	319.53	321.69	323.85	326.01	328.17	330.33	332.49	334.64	336.80	338.96
9	310.59	312.70	314.81	316.93	319.04	321.15	323.26	325.38	327.49	329.60	331.72
10	303.99	306.06	308.13	310.20	312.27	314.33	316.40	318.47	320.54	322.61	324.67
11	297.59	299.61	301.64	303.66	305.68	307.71	309.73	311.76	313.78	315.81	317.83
12	291.36	293.34	295.32	297.30	299.29	301.27	303.25	305.23	307.21	309.20	311.18
13	285.30	287.24	289.18	291.12	293.06	295.00	296.95	298.89	300.83	302.77	304.71
14	279.41	281.31	283.21	285.11	287.01	288.91	290.82	292.72	294.62	296.52	298.42
15	273.68	275.54	277.41	279.27	281.13	282.99	284.85	286.71	288.58	290.44	292.30
16	268.11	269.93	271.76	273.58	275.40	277.23	279.05	280.88	282.70	284.52	286.35
17	262.69	264.47	266.26	268.05	269.84	271.62	273.41	275.20	276.98	278.77	280.56
18	257.41	259.16	260.91	262.66	264.42	266.17	267.92	269.67	271.42	273.17	274.92
19	252.28	253.99	255.71	257.42	259.14	260.86	262.57	264.29	266.00	267.72	269.44
20	247.28	248.96	250.64	252.32	254.01	255.69	257.37	259.05	260.73	262.42	264.10
21	242.41	244.06	245.71	247.36	249.01	250.66	252.30	253.95	255.60	257.25	258.90
22	237.67	239.29	240.90	242.52	244.14	245.76	247.37	248.99	250.61	252.22	253.84
23	233.06	234.64	236.23	237.81	239.40	240.98	242.57	244.15	245.74	247.32	248.91
24	228.56	230.12	231.67	233.22	234.78	236.33	237.89	239.44	241.00	242.55	244.11
25	224.18	225.71	227.23	228.76	230.28	231.81	233.33	234.86	236.38	237.91	239.43
26	219.91	221.41	222.91	224.40	225.90	227.39	228.89	230.39	231.88	233.38	234.87
27	215.76	217.22	218.69	220.16	221.63	223.09	224.56	226.03	227.50	228.97	230.43
28	211.70	213.14	214.58	216.02	217.46	218.90	220.34	221.78	223.22	224.66	226.10
29	207.75	209.17	210.58	211.99	213.41	214.82	216.23	217.65	219.06	220.47	221.89
30	203.90	205.29	206.68	208.06	209.45	210.84	212.22	213.61	215.00	216.39	217.77
31	200.15	201.51	202.87	204.23	205.59	206.95	208.32	209.68	211.04	212.40	213.76
32	196.48	197.82	199.16	200.49	201.83	203.17	204.50	205.84	207.18	208.51	209.85
33	192.91	194.22	195.54	196.85	198.16	199.47	200.79	202.10	203.41	204.72	206.03
34	189.43	190.72	192.00	193.29	194.58	195.87	197.16	198.45	199.74	201.02	202.31
35	186.03	187.29	188.56	189.82	191.09	192.36	193.62	194.89	196.15	197.42	198.68

Presión oncótica o coloidosmótica de la solución BGP-HMP

Una solución de preservación efectiva debe prevenir, entre otras cosas, la expansión del espacio intersticial. Dicha expansión puede comprimir el sistema capilar y generar un aumento en la resistencia intrahepática, por lo que el órgano no se perfundirá de manera correcta y de esta forma se puede dañar la vasculatura. Para que esto no suceda, la solución de preservación debería contener alguna sustancia que genere soporte oncótico y posibilite controlar la distribución de agua entre el intersticio y la vasculatura durante la perfusión^{30,126}.

Nuestra solución BGP-HMP posee el agregado de PEG 35K, un polímero ampliamente estudiado y para el cual se han reportado beneficios en la mitigación del daño por isquemia y reperfusión^{127,128}. En el presente trabajo se determinaron los valores experimentales de COP para la solución BGP-HMP con el agregado de diferentes concentraciones de PEG 35K (1, 2, 5, 10 y 20 g/L a 20°C)¹¹¹. Del mismo modo, evaluamos los valores de COP para el agregado de otro agente coloide, el almidón hidroxietilado (HES), a fin de comparar los resultados para ambos y determinar que agente coloide influye más en la regulación de la COP (Figura 25).

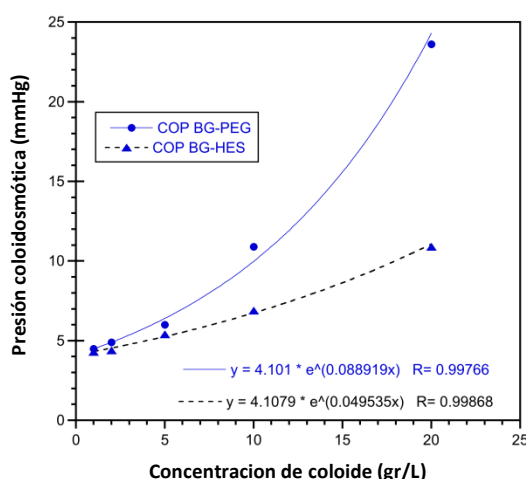


Figura 25. Efecto del agregado de diferentes concentraciones de PEG 35K y HES sobre la COP de la solución de preservación BGP-HMP. Las concentraciones más altas de PEG 35K dan como resultado una COP mayor que la observada para la misma concentración de HES. Los datos fueron ajustados por una ecuación exponencial.

Como puede verse en la figura, a similares concentraciones de agente coloide, la COP desarrollada por el PEG 35K es mayor que la medida para el HES. En el siguiente título analizaremos el efecto del mismo agregado de coloides sobre la viscosidad de la solución, parámetro que también es importante para regular la resistencia intrahepática, por lo que ambos parámetros deben estar en equilibrio.

Viscosidad (η) de la solución de preservación BGP-HMP

Los efectos ejercidos por la temperatura y por el agregado de agentes coloides sobre la viscosidad de las soluciones de preservación no se han estudiado rigurosamente para los procedimientos donde se han empleado máquinas de

perfusión. A tal punto, creemos que es muy importante enfocarse en ello y en cómo esta combinación de efectos, sobre la viscosidad de la solución de preservación, afectan el resultado de la preservación y recuperación del órgano luego de ser implantado.

En el presente trabajo medimos la viscosidad de la solución BGP-HMP a diferentes temperaturas y con el agregado de diferentes concentraciones de los agentes coloides PEG 35K y HES. Es importante aclarar que la solución de preservación BGP-HMP fue desarrollada inicialmente para la perfusión hipotérmica ¹¹¹, pero la modificación de las concentraciones del agente coloide nos permite, de la misma manera, utilizarla en preservación estática ¹²⁹ como se describe más adelante en la tesis.

En la figura 26 se detallan los resultados obtenidos en todas las determinaciones de viscosidad que llevamos a cabo:

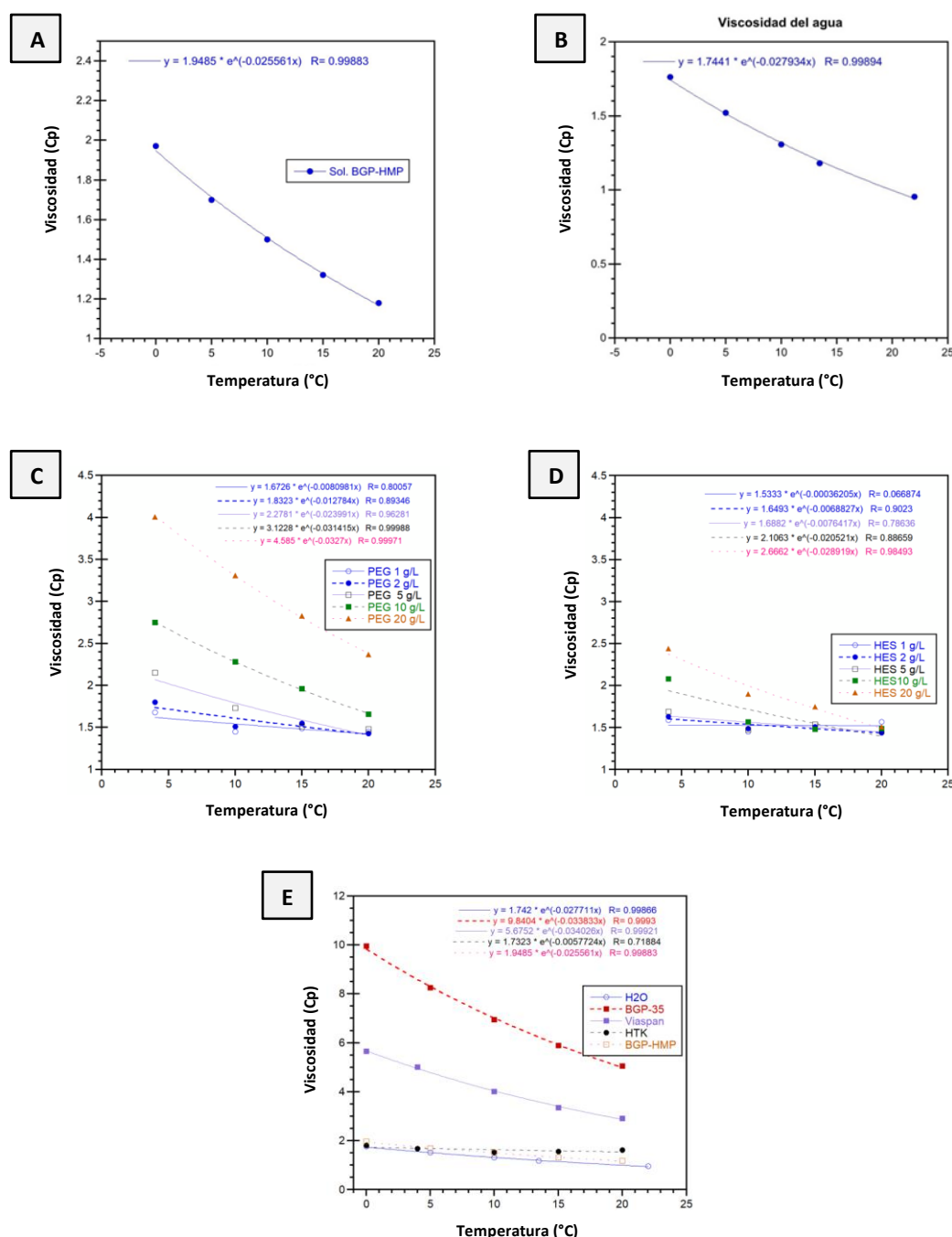


Figura 26 A) Viscosidad de la solución BGP-HMP en función de la temperatura. **B)** Viscosidad del H₂O_d en función de la temperatura. **C)** Viscosidad de la solución BGP-HMP con el agregado de diferentes concentraciones de PEG 35K en función de la temperatura. **D)** Viscosidad de la solución BGP-HMP con el agregado de diferentes concentraciones de HES en función de la temperatura. **E)** Efecto de la temperatura sobre la viscosidad de diferentes soluciones de preservación con respecto al agua. Viaspan® (solución UW), HTK (solución Custodiol®), BGP-HMP (Bes-Gluconato-Polietilenglicol para máquina de perfusión hipotérmica), BGP-35 (Bes-Gluconato-Polietilenglicol (40 g/L) para el almacenamiento en frío de microórganos hepáticos).

Todos los datos se ajustaron mediante una ecuación exponencial (las ecuaciones se muestran en los gráficos). Las curvas muestran claramente el aumento de la viscosidad debido a la disminución de la temperatura en todas las soluciones estudiadas.

La disminución de la temperatura aumenta exponencialmente la viscosidad de la solución; este efecto es magnificado por el aumento de la concentración de PEG 35K. La sustitución de PEG 35K por HES también aumenta la viscosidad de la solución de preservación con la reducción de la temperatura, pero este aumento en la concentración no afecta la viscosidad de la misma manera que el PEG 35K. Finalmente, comparamos concentraciones similares de ambos compuestos (PEG 35K y HES) a bajas temperaturas; la viscosidad del PEG 35K fue significativamente mayor que la viscosidad luego del agregado de HES.

En la preservación hipotérmica por SCS, el papel de la viscosidad de la solución de preservación se vuelve esencial durante el lavado del órgano y su distribución a través de toda la vasculatura. En cambio, en técnicas de perfusión, donde se requieren largos períodos de perfusión y buen funcionamiento de la vasculatura del órgano, la viscosidad de la solución de perfusión está asociada con la concentración del agente oncótico en un delicado equilibrio entre el control del edema intersticial, el flujo de perfusión y la resistencia vascular ²⁸.

EVALUACIÓN DE LA TEMPERATURA ÓPTIMA DE PERFUSIÓN

Las primeras pruebas que se realizaron con la máquina de perfusión desarrollada consistieron en determinar cuál era la temperatura óptima de preservación para los hígados de rata. En la literatura se reportan resultados inciertos, encontramos grupos que sostienen que la perfusión normotérmica o subnormotérmica es superadora con respecto a la hipotérmica ²⁸. Del mismo modo se pueden encontrar grupos que defienden a la perfusión hipotérmica como así también a la perfusión a temperaturas bajo cero sin la formación de hielo ⁷².

El objetivo principal de esta serie de experimentos consistió en obtener datos preliminares y orientativos respecto de la utilización de dos temperaturas de perfusión diferentes, 10°C y 5°C. Se busca determinar si podemos encontrar una diferencia en el rendimiento del protocolo de preservación de hígados por perfusión hipotérmica.

Protocolo experimental

Los hígados fueron procurados mediante la técnica quirúrgica a corazón batiente y fueron preservados con la solución comercial Custodiol®. Un grupo fue preservado durante 24 h mediante HMP a una temperatura de 10°C y otro grupo de la misma manera pero a 5°C. Ambos grupos, luego de ser preservados fueron evaluados en el sistema de perfusión *ex vivo* IPRL (Figura 27).

Grupo experimental	Descripción
HTK 5°C	Hígados aislados, preservados 24 h por HMP con solución HTK a 5°C y reperfundidos <i>ex vivo</i> .
HTK 10°C	Hígados aislados, preservados 24 h por HMP con solución HTK a 10°C y reperfundidos <i>ex vivo</i> .

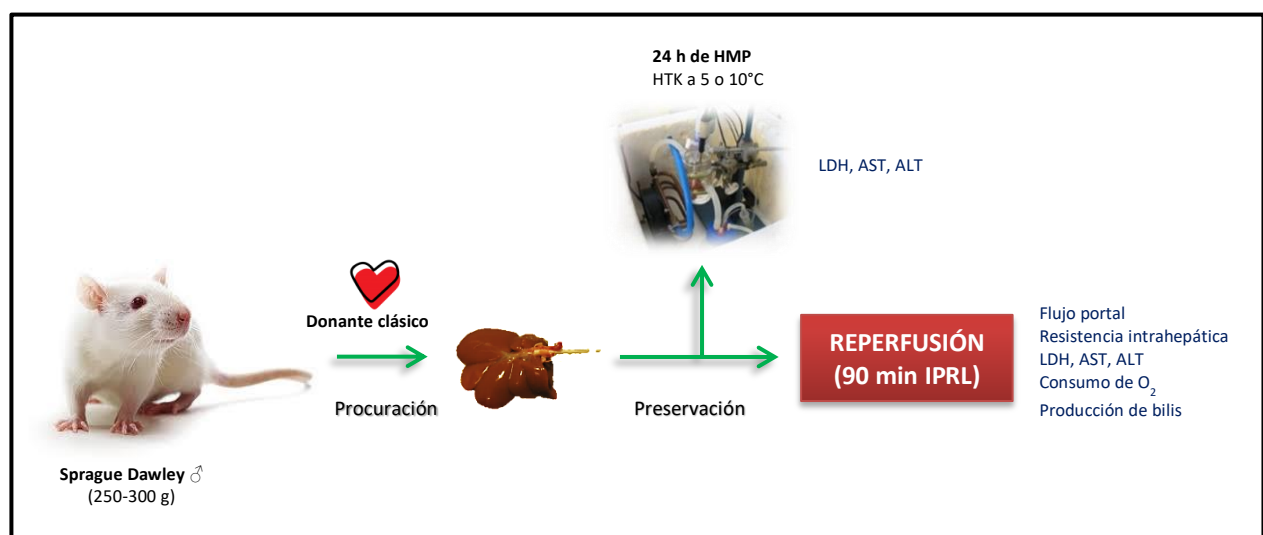


Figura 27. Diseño experimental para determinar la temperatura óptima de perfusión.

Resultados y discusión

• Rendimiento durante la preservación por perfusión hipotérmica

Durante las 24 horas que duró la preservación por perfusión hipotérmica se tomaron 4 muestras de la solución de preservación. Por cuestiones de logística de nuestro laboratorio los tiempos elegidos fueron 0, 4, 20 y 24 h. A cada muestra extraída se le midió la concentración de enzimas presentes en la misma, lo cual nos da una idea del daño celular producido por la isquemia fría.

Como era de esperar, para las tres enzimas evaluadas se registró un daño celular producido por la isquemia fría que es progresivo en el tiempo (Figura 28). Para el grupo preservado a 10°C tuvimos una desviación entre experimentos elevada, por lo que, probablemente a causa de ello, solamente encontramos diferencia estadísticamente significativa entre grupos para la enzima AST al tiempo final, siendo

mayor el daño justamente en el grupo preservado a 10°C. De todas formas, para las otras enzimas podemos ver la misma tendencia.

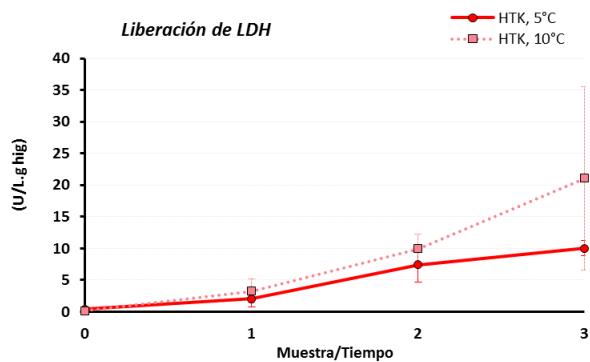
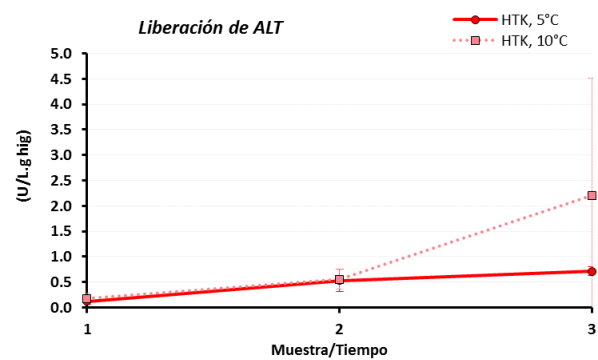
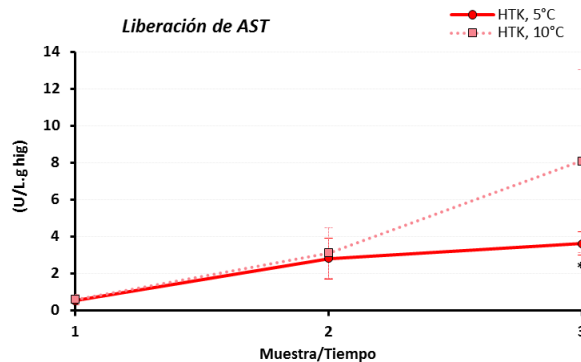


Figura 28. Evolución de la liberación de las enzimas hepáticas LDH, AST y ALT en función del tiempo de perfusión hipotérmica a 5 y 10°C. Cada punto representa la media \pm SD de 5 experimentos. * $p < 0.05$



• Rendimiento durante la reperfusión normotérmica

Parámetros hemodinámicos - Flujo Portal

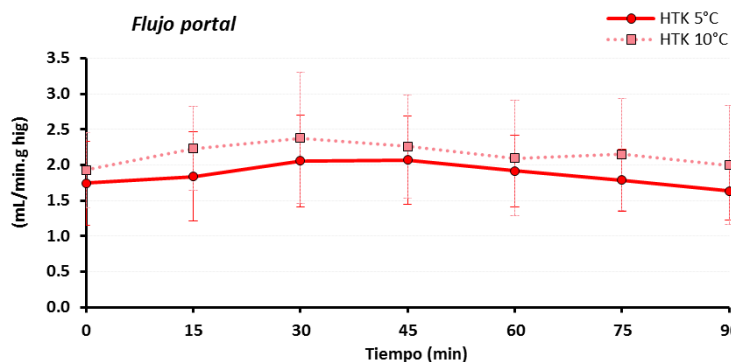


Figura 29. Evolución del flujo de perfusión en función del tiempo en un sistema aislado. Cada punto denota la media \pm SD de 5 experimentos. No se hallaron diferencias estadísticamente significativas.

En la figura 29 se representa la evolución del flujo que ingresa al hígado por la vena porta y circula por toda su microvasculatura durante la fase de reperfusión del órgano aislado a presión constante. Durante los 90 min de reperfusión normotérmica (37°C), para ambos grupos (HTK 5°C y HTK 10°C, estas temperaturas hacen referencia al período de preservación) se registró un flujo portal casi constante de aproximadamente 2 mL/min.g hig. No se vieron diferencias significativas entre ambos grupos sugiriendo la ausencia de un efecto sobre los parámetros hemodinámicos que puedan ser atribuidos a las temperaturas de preservación elegidas.

Producción de bilis

La producción de bilis se evaluó a través del cálculo del flujo de la secreción biliar en función del tiempo, como se observa en la figura 30. Los hígados perfundidos luego 24 h de perfusión hipotérmica a 5°C mostraron una alta capacidad de secreción biliar, alcanzando un flujo máximo de 0.47 $\mu\text{L}/\text{min}\cdot\text{g}$ híg a los 30 min y decreciendo luego hacia el final del período de reperfusión. La producción de bilis de los hígados preservados a 10°C fue menor, sin encontrarse diferencias estadísticamente significativas.

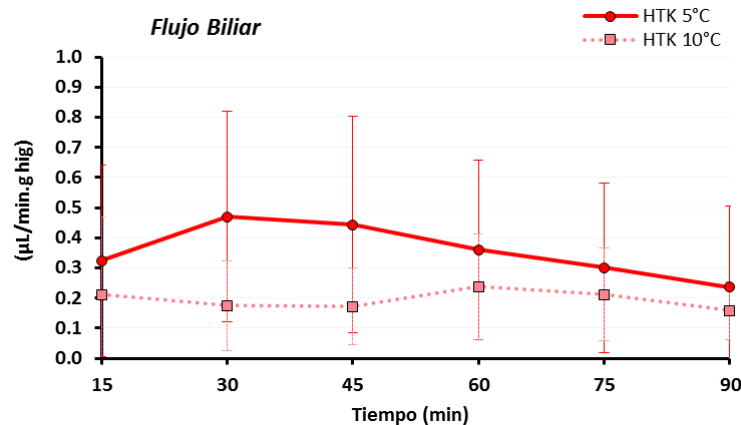


Figura 30. Flujo biliar. La bilis se recolectó en tubos previamente pesados cada 15 minutos, y el flujo biliar se estimó gravimétricamente en cinco experimentos separados para cada grupo analizado. No se encontraron diferencias significativas para ningún tiempo analizado.

Liberación de enzimas hepáticas

La acumulación de la enzima ALT (iguales resultados fueron obtenidos para las demás enzimas estudiadas) en el perfusato fue esquematizada en la figura 31. La liberación de enzimas se incrementa con el transcurrir del tiempo de reperfusión normotérmica, por ende el daño celular producido. Para ambos grupos el nivel de daño celular fue similar, por lo cual no encontramos efecto atribuible a la temperatura de preservación.

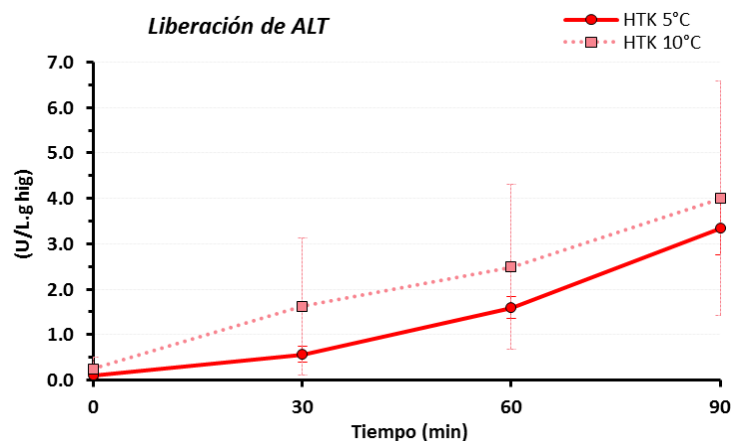


Figura 31. Liberación de la enzima hepática ALT en función del tiempo de perfusión normotérmica. Cada punto representa la media \pm SD de 5 experimentos. No se encontraron diferencias significativas entre los grupos estudiados.

Conclusión parcial

En este apartado se exponen los primeros resultados obtenidos utilizando la HMP desarrollada en el marco de ésta tesis. La misma fue aplicada a la perfusión de hígados de rata con la solución de preservación HTK a dos temperaturas diferentes.

Los hígados fueron perfundidos durante 24 h en solución HTK y luego fueron reperfundidos en un sistema aislado (IPRL) que permitió el estudio de diversos parámetros que reflejan el estado de la fisiología hepática. Este modelo *in vitro*, ampliamente utilizado en la investigación de la fisiopatología del hígado, constituye una alternativa al trasplante hepático experimental muy interesante. Si bien se trata de un sistema aislado y controlado, al mismo tiempo, conserva la complejidad del órgano con sus diferentes tipos celulares interaccionando entre sí y su arquitectura tridimensional intacta. Además, vale la pena destacar que el número de animales para experimentación se reduce a la mitad. No obstante, son numerosas las variables que intervienen en los resultados: temperatura, pH, presión de O₂, funcionamiento de la bomba, posicionamiento de los catéteres, elección del perfusato y tiempo de análisis son algunas de las más importantes. Por esta razón, el entrenamiento manual y la estandarización de la práctica, resultan fundamentales y se van desarrollando con el tiempo. Lo expuesto anteriormente explica, en parte, la variabilidad experimental observada en esta serie de ensayos.

Los resultados obtenidos señalaron que la mayoría de los parámetros estudiados no presentaron diferencias significativas entre los grupos estudiados. Durante la perfusión hipotérmica pudimos encontrar un menor daño celular, reflejado en la menor liberación de enzimas hepáticas en el grupo preservado a 5°C. En base a estos resultados y a la diversidad de datos respaldando diversas temperaturas óptimas de trabajo que podemos encontrar en la bibliografía, consideramos utilizar para los próximos ensayos la temperatura de perfusión de 5°C.

PRIMEROS ESTUDIOS DE PERFUSIÓN HIPOTÉRMICA DE HÍGADOS DE RATA EMPLEANDO LA SOLUCIÓN DE PRESERVACIÓN BGP-HMP

La máquina de perfusión hipotérmica es una técnica dinámica que hace fluir de manera continua una solución de preservación por el órgano y lo perfunde de manera de mantener un metabolismo residual, el cual depende de la generación de energía. En mamíferos, esto es sinónimo de necesidad de oxígeno para poder llevar a cabo el metabolismo aeróbico, el mismo es entregado a través de la perfusión vascular. Además de esto, la HMP permite aplicar maniobras farmacológicas sobre el órgano que está siendo preservado y extraer muestras de perfusato para ser analizadas.

Como método dinámico de preservación dinámico, la HMP representa una alternativa viable para aumentar la cantidad de órganos disponibles para trasplantes, pudiendo revertir la escasez de los mismos y suplir las listas de esperas en creciente demanda en todo el mundo. Ahora bien, para que la HMP sea efectivamente una técnica capaz de recuperar órganos y aumentar el pool disponible, es necesario avanzar también en el estudio de los parámetros implicados en la preservación. Uno de ellos es la elección de la solución de preservación. En nuestro caso proponemos la

utilización de una solución de desarrollo propio, con una composición fisicoquímica exclusivamente pensada para la perfusión a bajas temperaturas.

Con el fin de comprobar si nuestra solución de preservación BGP-HMP, caracterizada en un apartado anterior, resulta adecuada para ser utilizada mediante la técnica de preservación hipotérmica a través de la máquina de perfusión hipotérmica, se realizaron perfusiones de hígados a 5°C durante 24 horas. Los estudios que se llevaron a cabo comparan los resultados obtenidos para nuestra solución BGP-HMP contra los obtenidos para la solución comercial HTK, ampliamente utilizada en la clínica.

Protocolo experimental

Los hígados fueron procurados mediante la técnica quirúrgica a corazón batiente y fueron preservados durante 24 h mediante HMP a una temperatura de 5°C. En este caso se evaluaron tres grupos experimentales, un grupo preservado con la solución BGP-HMP, otro preservado con la solución comercial HTK, y un tercero que representa nuestro control el cual no fue preservado. Este último fue evaluado inmediatamente luego del aislamiento en el sistema IPRL de perfusión *ex vivo*, como un control del funcionamiento hepático en nuestras condiciones experimentales. Los grupos preservados también fueron evaluados en el mismo sistema (Figura 32).

Grupo experimental	Descripción
Control	Hígados aislados y reperfundidos <i>ex vivo</i> .
BGP-HMP 5°C	Hígados aislados, preservados 24 h por HMP con solución BGP-HMP a 5°C y reperfundidos <i>ex vivo</i> .
HTK 5°C	Hígados aislados, preservados 24 h por HMP con solución HTK a 5°C y reperfundidos <i>ex vivo</i> .

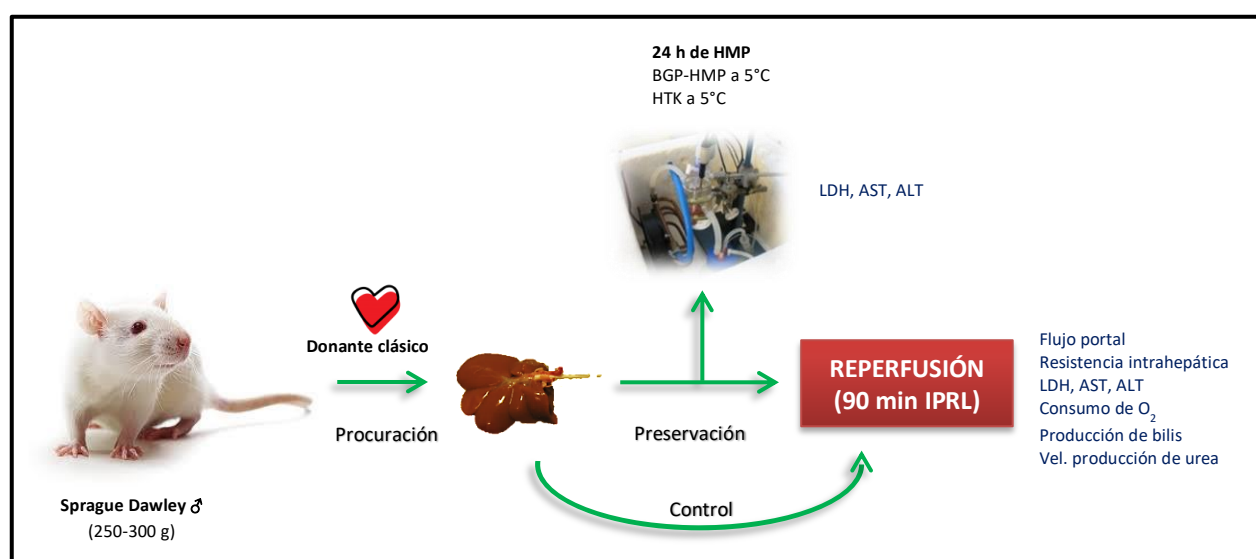


Figura 32. Diseño experimental para determinar si la solución de preservación BGP-HMP es adecuada para perfundir hígados de rata por HMP.

Resultados y discusión

• Rendimiento durante la preservación por perfusión hipotérmica

Al evaluar la liberación de enzimas hepáticas durante la perfusión hipotérmica, encontramos que a las 24 h de preservación la liberación de las enzimas LDH y AST fue mayor para el grupo preservado con la solución HTK ($p < 0,05$). La actividad enzimática en el perfusato fue (U/L.g hígado): LDH, $10,01 \pm 1,22$ (HTK), $6,20 \pm 1,03$ (BGP-HMP); AST, $3,63 \pm 0,62$ (HTK), $1,25 \pm 0,13$ (BGP-HMP). En contraste, para la liberación de ALT no se encontraron diferencias entre grupos (Figura 33).

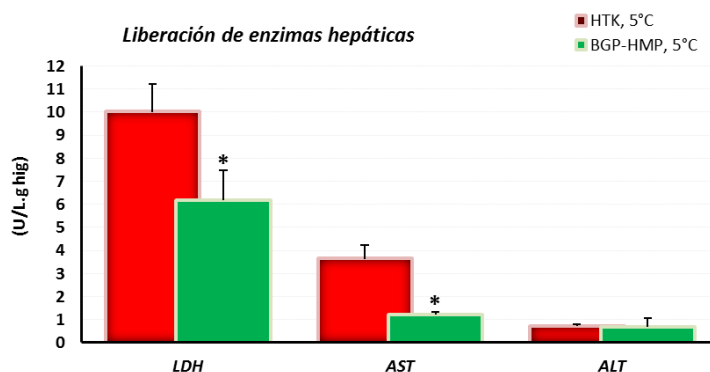


Figura 33. Liberación total de enzimas hepáticas en la solución de preservación luego de 24 h de HMP a 5°C.
n = 5 / * $p < 0,05$

• Rendimiento durante la reperfusión normotérmica

Parámetros hemodinámicos

En la figura 34 se puede observar la evolución de los parámetros hemodinámicos correspondientes a los hígados durante los 90 min de reperfusión normotérmica, luego de ser preservados por HMP durante 24 h.

El comportamiento del **flujo portal** de los hígados preservados con la solución BGP-HMP se muestra muy similar al de los hígados que no han sido preservados (grupo control). El flujo comienza levemente más bajo, pero con el correr de los minutos los hígados se estabilizan, el flujo alcanza su punto máximo y permanece de manera casi constante durante la totalidad del experimento. Para el caso de los hígados preservados con la solución HTK, el flujo de perfusión fue significativamente menor en relación con los grupos BGP-HMP y control. Estos hígados, a una presión constante de aproximadamente 100 mmH₂O, toleraron prácticamente un flujo de perfusión igual a la mitad del presentado por los controles. A su vez, se nota una disminución del mismo durante la última media hora de perfusión (Figura 34 A).

La **resistencia intrahepática** constituye un reflejo del estado de la microvasculatura del hígado y es un parámetro inversamente proporcional al flujo de perfusión. En la figura 34 B se esquematiza el cambio en la resistencia vascular a medida que avanza el tiempo de reperfusión de los hígados previamente almacenados durante 24 h. Se puede observar, en rojo, el comportamiento de este parámetro para los hígados que fueron preservados con la solución HTK. Estos hígados presentaron una resistencia

intrahepática muy superior a la mostrada por los otros grupos, con un ascenso de la misma a medida que pasaban los minutos de reperfusión.

En base a los resultados descriptos para los dos parámetros hemodinámicos podemos resumir que los hígados preservados con la solución de preservación BGP-HMP por la técnica de perfusión hipotérmica presentan un mayor rendimiento hemodinámico y una microvasculatura mejor preservada.

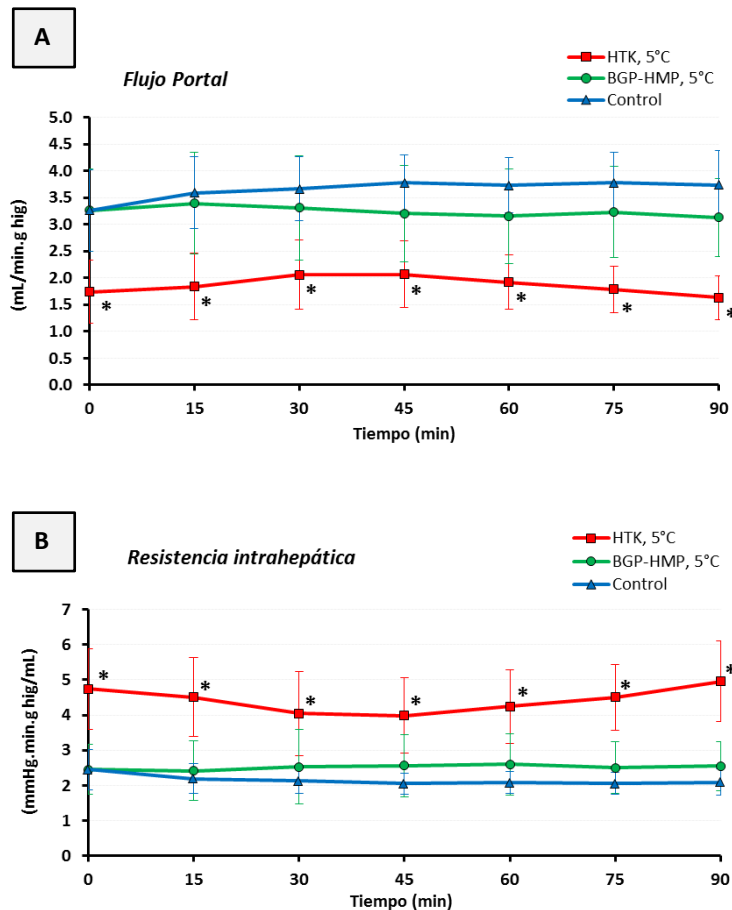


Figura 34. Evolución de los **parámetros hemodinámicos** durante la reperfusión normotérmica posterior a 24 h de HMP. A) El flujo portal de los hígados preservados con BGP-HMP fue mayor que para el grupo HTK. B) Los hígados del grupo BGP-HMP presentaron una resistencia vascular comparable con la de los controles sin preservar (n = 5 / *p<0.05).

Producción de bilis

La figura 35 refleja el comportamiento de la función secretora biliar a través del tiempo de perfusión aislada. Los hígados preservados con ambas soluciones fueron capaces de producir bilis de manera sostenida durante la reperfusión, pero en una proporción del 50% con relación a la cantidad producida por los hígados controles. Evidentemente la preservación hipotérmica generó un daño considerable a nivel de las vías biliares, parámetro que tendremos que seguir evaluando para mejorar en este aspecto.

Consumo de Oxígeno

La figura 36 muestra el consumo de O_2 durante los experimentos de reperfusión aislada, luego de 24 horas de preservación por HMP. Los hígados preservados con la solución BGP-HMP mantienen el metabolismo activo y muestran una capacidad de consumo de oxígeno aumentada en relación a la propia para los hígados preservados con HTK ($p < 0,05$). Los hígados preservados con nuestra solución BGP-HMP fueron capaces de captar más O_2 ($\mu\text{mol}/\text{min.g}$ hígado) que los hígados preservados con HTK: $1,16 \pm 0,16$ vs. $0,65 \pm 0,1$ a tiempo final respectivamente.

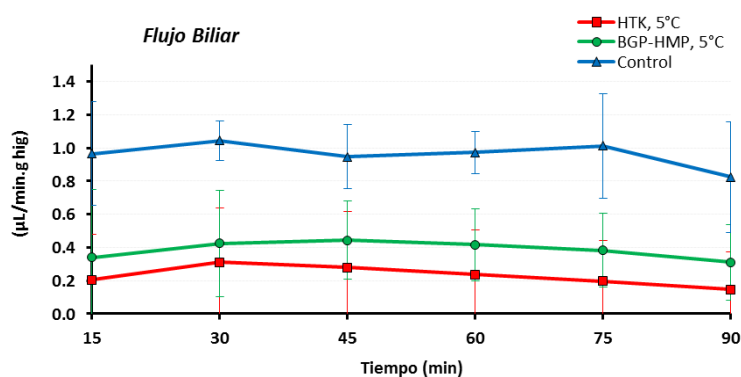


Figura 35. Evolución de la **producción de bilis** en función del tiempo de perfusión en un sistema aislado. Cada punto denota la media \pm SD de 5 experimentos.

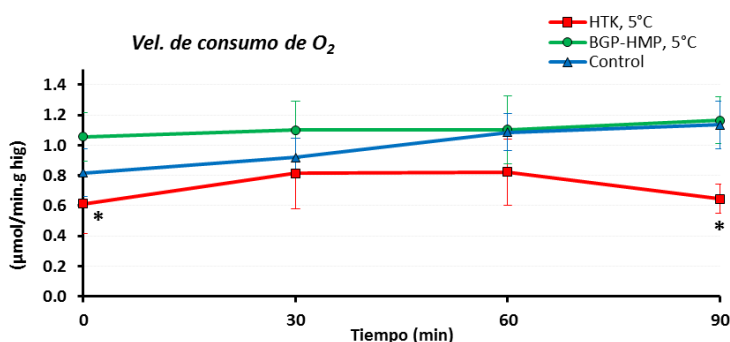


Figura 36. Evolución del **consumo de O_2** en función del tiempo de perfusión en un sistema aislado. Los hígados preservados con la solución BGP-HMP mostraron una tasa de consumo de oxígeno superior a la mostrada por los hígados del grupo HTK. $n = 5$ / * $p < 0,05$

Liberación de enzimas hepáticas: LDH, AST y ALT

La figura 37 muestra las concentraciones de enzimas citoplasmáticas acumuladas en el perfusato al final de los ensayos de reperfusión aislada. La injuria celular ocasionada por daños al endotelio durante la reperfusión y la activación de vías de muerte celular por apoptosis/necrosis es comúnmente evaluada a través de la liberación de enzimas como la LDH y las transaminasas. Para las tres enzimas evaluadas encontramos

diferencias significativas entre los grupos, siendo ampliamente mayor la liberación por parte de los hígados preservados con la solución HTK. Al relacionar los datos de liberación de los grupos experimentales preservados vs los de un control sin almacenamiento en frío, resulta evidente que las 24 h de isquemia fría tuvieron como consecuencia un cierto grado de daño tisular.

Estos resultados indican que la solución BGP-HMP es capaz de mantener una mayor integridad de membrana de los hepatocitos y permite reducir las injurias causadas por la preservación hipotérmica y por la isquemia/reperfusión de los hígados.

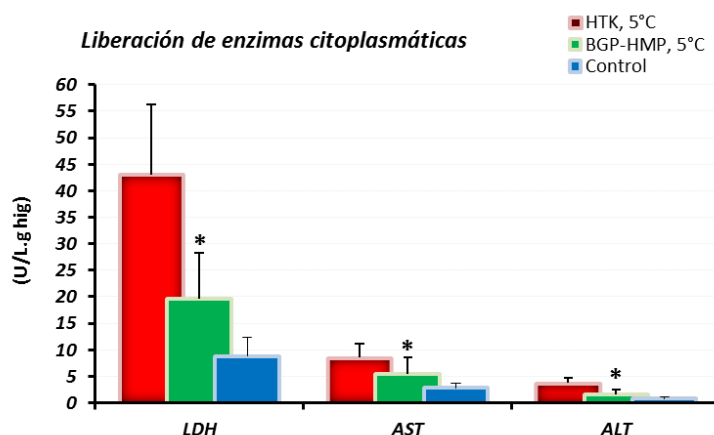


Figura 37. Liberación de enzimas citoplasmáticas. Cuantificación de la actividad enzimática acumulada al tiempo final de la reperfusión normotérmica (90 min) para las enzimas LDH, AST y ALT (n = 5 / *p<0,05).

Síntesis de urea

La figura 38 esquematiza la capacidad de síntesis de urea en los 90 min de perfusión. Siendo una de las funciones principales del hígado, la síntesis de este metabolito indica el estado funcional hepático durante la reperfusión post-perfusión hipotérmica. La síntesis de urea en el hígado es la principal ruta de eliminación del nitrógeno del organismo. Las enzimas del ciclo de la urea comienzan a disminuir su actividad cuando el hígado entra en disfunción por alguna patología, por lo tanto, este parámetro es un buen indicador de funcionalidad metabólica del hígado ¹¹⁵.

La capacidad de síntesis de los hígados fue evaluada a través de la tasa de producción de urea durante la perfusión *ex vivo*. No se encontraron diferencias significativas en la producción de urea, indicando que la urogénesis en los hígados preservados se mantiene a la misma intensidad que lo hacen aquellos hígados que no fueron preservados. Esto implicaría que la síntesis de urea no es un parámetro que se encuentre particularmente afectado en nuestro modelo experimental. No obstante, tenemos que aclarar que la amplitud de los valores obtenidos podría estar enmascarando los resultados.

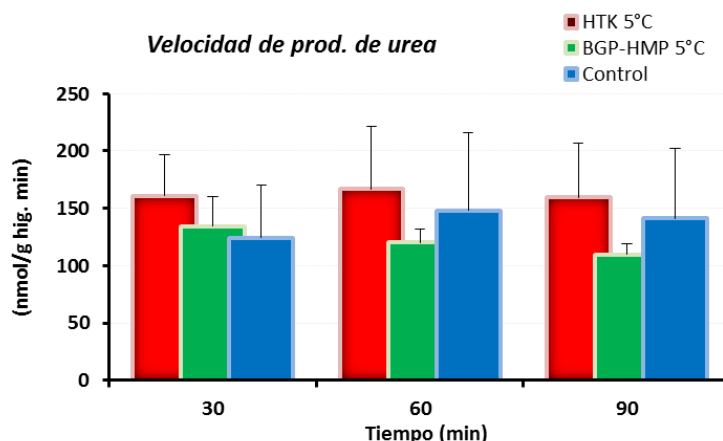


Figura 38. Velocidad de producción de urea durante la reperfusión normotérmica. No se encontraron diferencias entre los grupos.

Conclusión parcial

El propósito de la preservación de órganos en el contexto del trasplante es poder suministrar órganos viables que comiencen a funcionar inmediatamente luego de su implante en el receptor. El tiempo necesario para realizar el traslado del órgano y organizar los equipos de cirugía, es proporcionado a través de la técnica de preservación hipotérmica. Sin embargo, hoy en día, la preservación estática convencional se ha estancado en su desarrollo limitando los tiempos de procuración, el número de órganos viables para implantar y el éxito en sí de la terapia del trasplante.

En los últimos años, tomaron fuerza nuevamente las técnicas de perfusión de órganos, las cuales tienen la potencialidad de rescatar órganos marginales. En la presente tesis proponemos estudiar este campo, incorporando una solución de preservación y una máquina de perfusión especialmente diseñadas para preservar hígados de rata en hipotermia. En este apartado evaluamos nuestra solución por primera vez y la comparamos con la solución comercial HTK.

Los resultados obtenidos resultan promisorios, ya que bajo las condiciones estudiadas los hígados preservados con nuestra solución de preservación BGP-HMP y nuestra máquina de perfusión hipotérmica fueron capaces de mantener un metabolismo sintético activo, la resistencia intrahepática se vio reducida al ser comparada con las obtenidas para la solución HTK, y la velocidad de captación del O₂ también fue mayor. De igual manera, los hígados del grupo BGP-HMP presentaron menor daño celular, por lo que la solución de preservación BGP-HMP puede mantener de mejor manera la integridad de membrana y, además, reduce el daño por preservación/isquemia/reperfusión.

MODELO DE DONANTE A CORAZÓN PARADO EN LA RATA (DCD)

El trasplante hepático ha evolucionado y se ha perfeccionado aceleradamente desde las primeras experiencias en la década del 60. Como resultado de la creciente aceptación del trasplante como la terapia de elección para un sinnúmero de patologías

hepáticas, la disponibilidad de órganos aptos para trasplante se convierte en una gran limitación y, por ende, en el problema de mayor preocupación reflejado en las largas listas de espera por un hígado sano.

Los órganos provenientes de DCD son desestimados actualmente en la mayoría de los centros de trasplante debido al período de isquemia caliente (IC) que invariablemente atraviesan antes de la perfusión con solución de preservación. La IC profundiza el daño por isquemia/reperfusión inherente al proceso del trasplante, aumentando el riesgo de fracaso de la cirugía. No obstante, la escasez de donantes clásicos (diagnóstico de muerte cerebral) ha llevado a reconsiderar el uso de órganos “marginales” como los DCD, cuyas desventajas demandan la optimización de los protocolos de preservación mediante el desarrollo de nuevas estrategias.

En particular, nos propusimos a través de un modelo de donante a corazón no batiente en ratas y la máquina de perfusión hipotérmica, tratar de rescatar estos hígados isquémicos y evaluarlos contra otros que no han sufrido un tiempo de IC.

Protocolo experimental

Como método desencadenante del arresto cardíaco escogimos la sobrecarga de K^+ , aplicada en un trabajo de García-Valdecasas⁹⁴ y puesta a punto en nuestro laboratorio^{103,130}. En resumen, tras haber cateterizado el hígado, se inyectan 300 μ L de una solución de heparina 500 UI/mL + KCl 2 M vía vena femoral. El ion K^+ en altas concentraciones despolariza las membranas celulares del músculo cardíaco, generando en consecuencia el arresto cardíaco dentro de los 30 segundos.

Teniendo en cuenta resultados anteriormente obtenidos por el grupo de trabajo, se estableció un lapso de IC de 45 min para el modelo de donación de hígado a corazón no batiente. Esta extensión de tiempo previa al almacenamiento en frío se encuentra dentro de los límites de reversibilidad del daño según datos hallados en la bibliografía,¹³¹ pero al mismo tiempo induce una mayor injuria por isquemia/reperfusión respecto de los hígados controles de donantes a corazón batiente.

Un grupo de hígados de rata DCD fue preservado con nuestra solución de preservación BGP-HMP y posteriormente evaluado en el sistema IPRL. En una primera instancia este grupo isquémico fue comparado con un grupo de hígados el cual no había sufrido un período de IC; en una segunda etapa el grupo DCD preservado por HMP fue comparado con un grupo de hígados DCD preservados por SCS con solución HTK y contra un grupo control de hígados DCD sin preservar (Figura 39).

Grupo experimental	Descripción
BGP-HMP 5°C	Hígados aislados, preservados 24 h por HMP con solución BGP-HMP a 5°C y reperfundidos <i>ex vivo</i> .
Control 45'IC	Hígados con 45 min de IC aislados y reperfundidos <i>ex vivo</i> .
BGP-HMP 5°C y 45' IC	Hígados con 45 min de IC preservados 24 h por HMP con solución BGP-HMP a 5°C y reperfundidos <i>ex vivo</i> .
SCS HTK 5°C y 45' IC	Hígados con 45 min de IC preservados 24 h por SCS con solución HTK a 5°C y reperfundidos <i>ex vivo</i> .

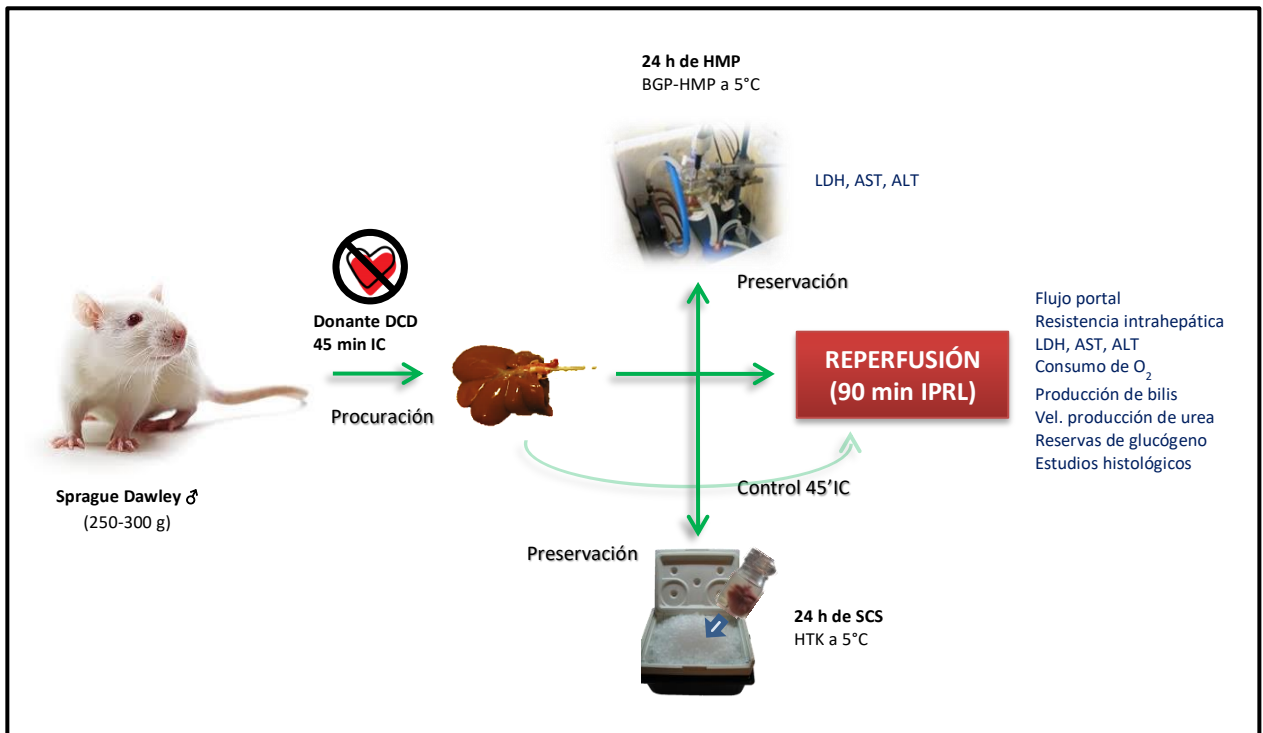


Figura 39. Diseño experimental para determinar si la solución de preservación BGP-HMP es adecuada para recuperar hígados de ratas DCD por HMP.

La HMP en la recuperación de órganos provenientes de DCD - Evaluación de la solución BGP-HMP en el sistema de perfusión hipotérmica HMP

Resultados y discusión

• Rendimiento durante la preservación por perfusión hipotérmica

Como mencionamos anteriormente, los órganos provenientes de DCD inevitablemente presentan daño celular inducido por la isquemia. Al evaluar la liberación de enzimas citoplasmáticas en la solución de preservación durante el período de HMP, podemos comprobar esto, al encontrar mayor liberación en los hígados del grupo BGP-HMP + 45' de IC (Figura 40). El gran reto de la preservación por HMP, de nuestra solución BGP-HMP y de esta tesis, es lograr revertir este daño intrínseco de la IC presente en los órganos marginales DCD.

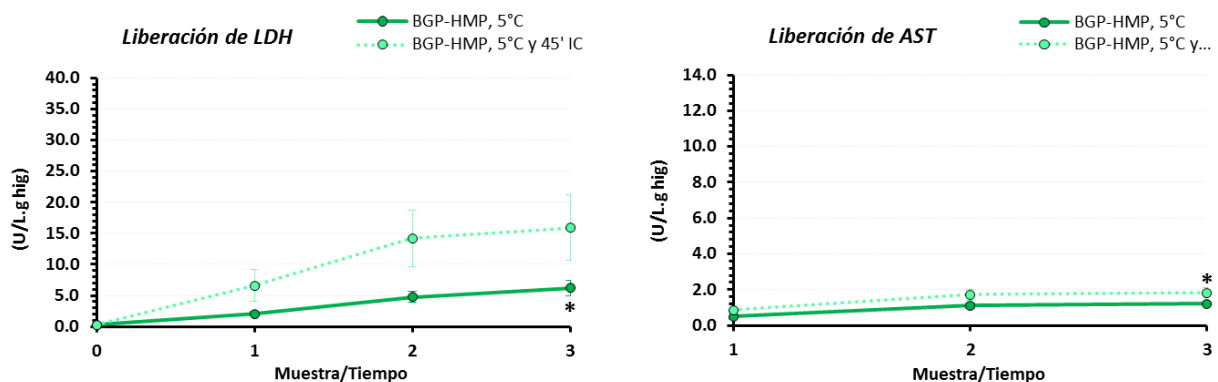


Figura 40. Evolución de la liberación de las enzimas LDH y AST durante las 24 h de perfusión hipotérmica en la HMP. Cada punto denota la media \pm SD de 5 experimentos. * indica diferencia estadísticamente significativa entre grupos con $p < 0,05$.

- **Rendimiento durante la reperfusión normotérmica**

Liberación de enzimas hepáticas: LDH, AST y ALT

Durante la preservación por HMP notamos que los hígados que habían sufrido un período de isquemia caliente presentaron una mayor liberación de enzimas hepáticas, hecho que se deduce en daño a nivel celular. En la figura 41 podemos observar que este daño fue revertido durante el período de reperfusión en el IPRL. Si bien se genera un daño celular progresivo en el tiempo, entre ambos grupos de estudio no hay diferencias estadísticamente significativas.

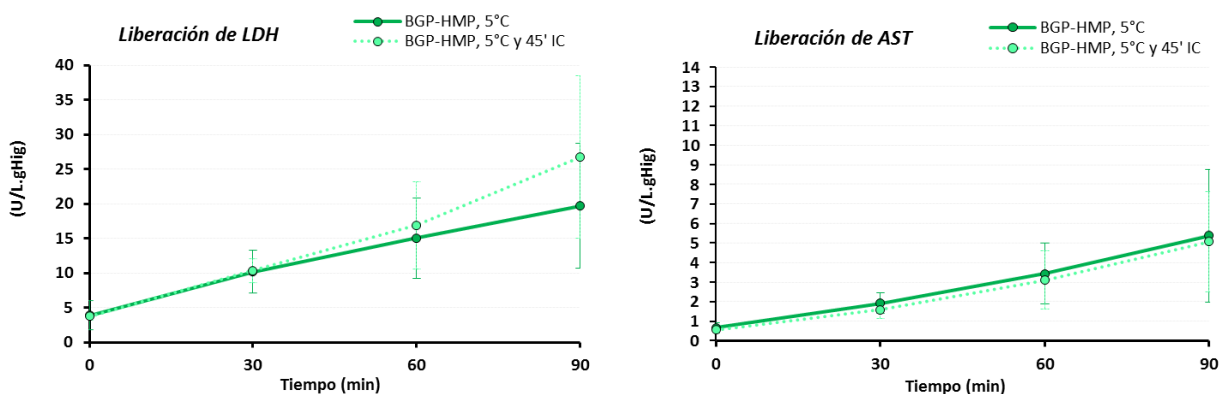


Figura 41. Liberación de **enzimas hepáticas** durante los 90 min de reperfusión normotérmica. No se encontraron diferencias entre los hígados que sufrieron una IC (DCD) y los órganos provenientes de DBD. La evolución de las tres enzimas estudiadas muestra el mismo patrón.

Parámetros hemodinámicos

La figura 42 muestra la evolución del flujo de perfusión portal en función del tiempo de reperfusión en el sistema IPRL. Los hígados con 45' de IC y preservados en la solución BGP-HMP presentaron un gran rendimiento hemodinámico y un comportamiento idéntico al de los hígados que no han sido procurados por el modelo de DCD. Estos resultados sugieren que la solución BGP-HMP y el procedimiento de preservación por HMP ejercieron un efecto restaurador sobre la microvasculatura y la misma se mantiene en perfectas condiciones; se pudieron minimizar los efectos de la IC sobre la integridad de la red endotelial equiparando los valores de flujo entre éstos y los del grupo sin IC.

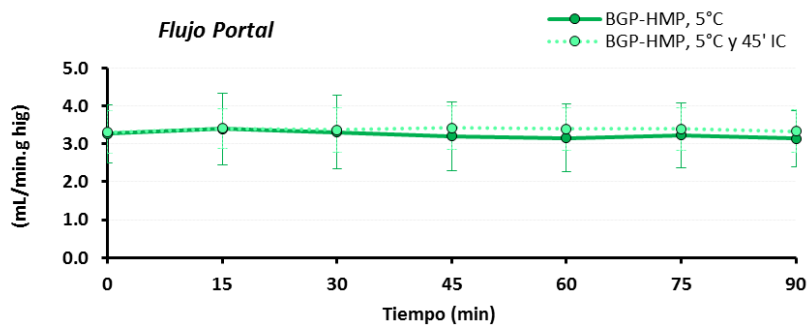


Figura 42. Evolución del **flujo de perfusión** en función del tiempo en un sistema aislado. Cada punto denota la media \pm SD de 5 experimentos. No se hallaron diferencias estadísticamente significativas entre grupos.

Consumo de Oxígeno

La figura 43 muestra el consumo de O_2 a lo largo de la perfusión *ex vivo*. Puede apreciarse que la captación de O_2 del medio para hígados pertenecientes al grupo con IC previa no muestra ninguna diferencia con respecto a los que no la han sufrido ($p < 0,05$). Transcurridos 90 min de perfusión, los hígados de ambos grupos presentaron un consumo de oxígeno de $1,09 \pm 0,17 \mu\text{mol } O_2/\text{min.g hig}$ (BGP-HMP + 45' IC) y $1,16 \pm 0,16 \mu\text{mol } O_2/\text{min.g hig}$ (BGP-HMP).

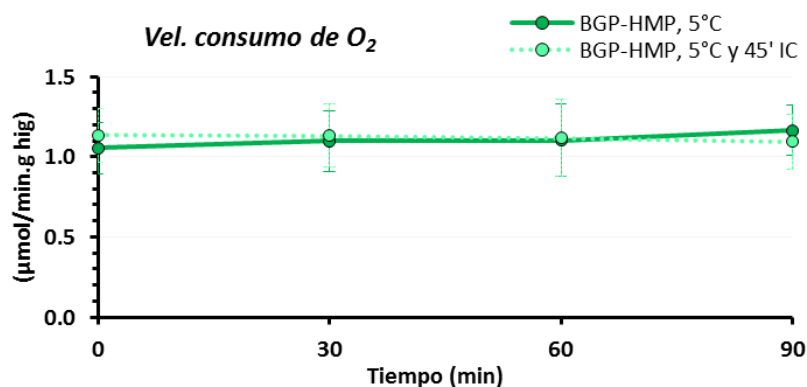


Figura 43. Evolución del **consumo de O_2** en función del tiempo de perfusión en un sistema aislado. Cada punto corresponde la media \pm SD de 5 experimentos. No se encontraron diferencias significativas entre grupos.

Conclusión parcial

El reacondicionamiento de hígados provenientes de donantes a corazón no batiente (DCD) ofrece la oportunidad de mejorar los resultados y también aumentar la disponibilidad de este tipo de órganos marginales. El avance en la comprensión de los fenómenos patofisiológicos asociados a la donación tras el cese cardíaco ha fomentado el desarrollo de nuevas alternativas en las distintas etapas del procedimiento de

trasplante, como por ejemplo la búsqueda de nuevas soluciones de preservación y perfeccionamiento de las técnicas de perfusión.

En estos experimentos se planteó la posibilidad de revertir el daño provocado por la isquemia caliente durante la fase de preservación hipotérmica; una etapa generalmente ineludible del trasplante ante la necesidad de disponer de un tiempo para la preparación de la cirugía.

En nuestros experimentos pudimos observar que durante la reperfusión normotérmica los hígados de ambos grupos no presentaron diferencias significativas para ninguno de los parámetros estudiados. Por lo tanto, si bien los hígados provenientes de DCD presentaron un mayor daño celular producido por la isquemia de 45 minutos a la que fueron expuestos, luego de la preservación por HMP el daño fue revertido y se recuperaron todos los parámetros metabólicos, así como también los hemodinámicos.

Las diferencias encontradas para la liberación de enzimas hepáticas entre grupos durante la preservación hipotérmica revelaron una diferencia significativa entre hígados procurados 45 minutos post-cese cardíaco e hígados extraídos a corazón batiente, validando así, el modelo de donante a corazón parado utilizado. El sistema IPRL de perfusión *ex vivo* constituyó una herramienta fundamental en la evaluación del estado funcional de los hígados, pero a su vez tiene algunas limitaciones que nos sesgan el análisis; no estamos considerando todas las variables que podrían influir en la exacerbación o aminoración del daño por isquemia/reperfusión sufrido por los hígados. En este sentido, la perfusión con sangre entera o derivados, por ejemplo a través del trasplante experimental, podría aportar un cuadro más completo de lo que sucede durante la reperfusión de estos órganos.

HMP vs SCS. Comparación de diferentes técnicas de preservación de órganos empleando hígados provenientes de ratas DCD

Existen numerosos reportes experimentales y clínicos indicando que la HMP es una técnica más apropiada que la preservación estática por SCS para rescatar hígados provenientes de donantes marginales, particularmente DCD ¹³². En base a estos registros, y considerando que en argentina solamente se emplea SCS en la práctica clínica, nos pusimos como objetivo en dicha parte del trabajo comparar la eficiencia de los dos métodos de preservación de órganos (SCS y HMP) para preservar los hígados provenientes de DCD que han sufrido un período de 45 min de isquemia caliente.

Como se explica al comienzo del apartado, en este caso comparamos dos grupos experimentales de hígados provenientes de ratas donantes DCD con 45 min de IC. En una primera instancia un grupo fue preservado con la solución BGP-HMP por la técnica de perfusión hipotérmica, y el otro grupo fue preservado con la solución Custodiol® por la técnica de SCS ¹⁰³. Posteriormente hacemos un análisis comparando la preservación de hígados DCD preservados por ambas técnicas de preservación, pero en este caso utilizando la solución BGP-HMP para los dos grupos.

Resultados y discusión (HMP con BGP-HMP y 45' IC vs SCS con HTK y 45' IC)

Parámetros hemodinámicos

En la figura 44 se muestra la evolución de los parámetros hemodinámicos de los hígados que han sufrido un período de IC de 45 min y fueron preservados por SCS o por HMP. La máquina de perfusión hipotérmica es un método que mantiene estimulada la microvasculatura al ofrecer una perfusión continua durante la totalidad de la etapa de preservación, este hecho se ve reflejado en los resultados obtenidos. Al analizar el **flujo portal** de perfusión (figura 44 A), los hígados del grupo preservado por HMP con la solución BGP-HMP mostraron un flujo constante durante los 90 min de reperfusión y muy superior con relación a los preservados por SCS con la solución HTK ($p < 0.05$).

En la misma línea, la **resistencia intrahepática** (figura 44 B) fue menor en los hígados preservados por HMP, con un comportamiento muy similar al de los hígados control sin preservar. A los 60 y 90 min de reperfusión encontramos diferencias con relación al grupo SCS + HTK.

Estos resultados son importantes teniendo en cuenta que luego de 24 horas de preservación en isquemia fría, la circulación hepática posee un alto grado de conservación y las alteraciones en la microcirculación constituyen un factor determinante en el fallo primario post-trasplante.

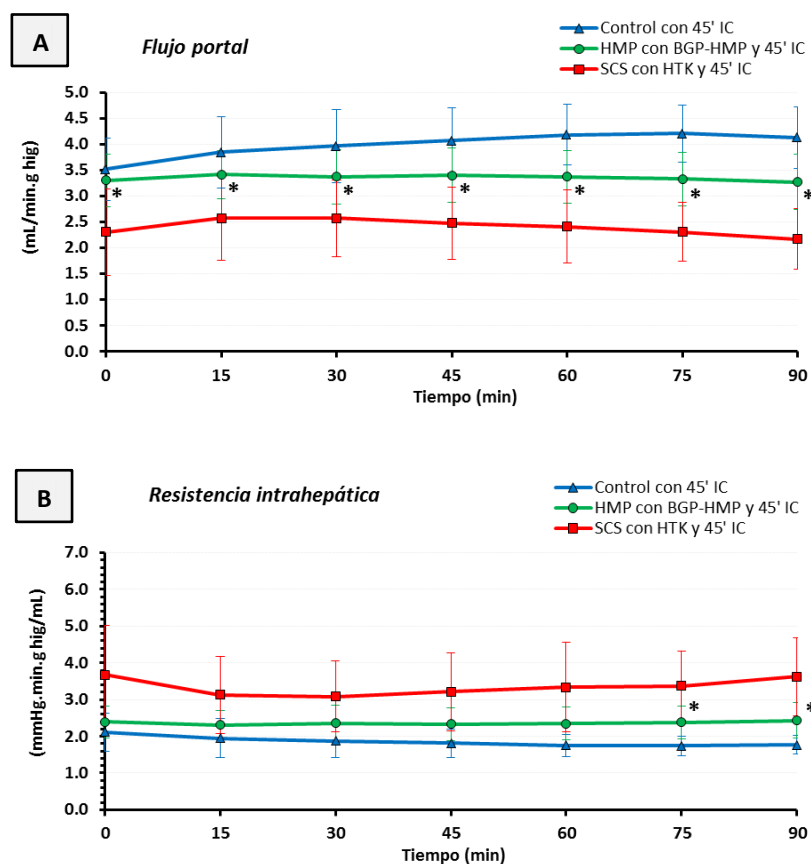


Figura 44. Parámetros hemodinámicos. A) Evolución del flujo portal en función del tiempo de reperfusión normotérmica de hígados procurados de donantes DCD. **B)** Resistencia vascular ejercida por los hígados durante la reperfusión. Cada punto denota la media \pm SD de 5 experimentos. * indica diferencia estadísticamente significativa entre los grupos preservados ($p < 0,05$).

Producción de bilis

En la figura 45 podemos observar cómo evolucionó la función hepática secretora durante los 90 minutos de reperfusión normotérmica. Todos los hígados tratados respondieron inmediatamente durante la reperfusión, y demostraron una excelente producción de bilis, pero el flujo biliar fue notablemente menor en el grupo preservado por HMP con la solución BGP-HMP ($p < 0,05$). Analizando este fenómeno, podemos conjeturar que podría deberse al lavado de las sales biliares durante las 24 h de perfusión continua a la que se expone el hígado en la HMP, ya que la solución de preservación no posee el agregado de precursores biliares. Otro aspecto interesante a considerar es el suministro de sangre; en contraste con los hepatocitos, que reciben un doble suministro de sangre, las células de las vías biliares solo reciben el suministro de sangre por vía arterial y es más vulnerable al daño isquémico. En nuestro modelo solo perfundimos el hígado a través de la vena porta, ignorando la arteria hepática debido a la complicada manipulación durante la cirugía; por lo tanto, el tracto biliar probablemente no recibió suficiente oxígeno y se vio dañado.

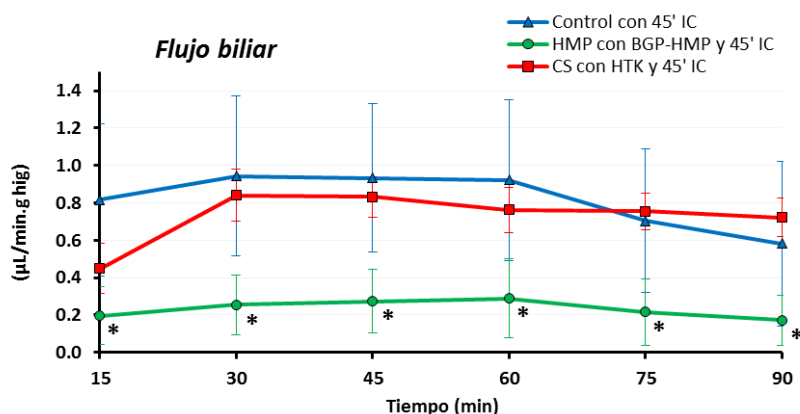


Figura 45. Flujo biliar durante los 90 min de reperfusión en el IPRL. Cada punto denota la media \pm SD de 5 experimentos. * indica diferencia estadísticamente significativa entre los grupos preservados ($p < 0,05$).

Consumo de oxígeno (Figura 46)

El estudio de la velocidad con que los hígados consumen oxígeno nos da una idea de la actividad metabólica de los mismos. Aquellos preservados por HMP con la solución BGP-HMP mostraron tasas de consumo de O_2 significativamente mayores a todos los tiempos estudiados que los preservados por SCS y los controles con IC.

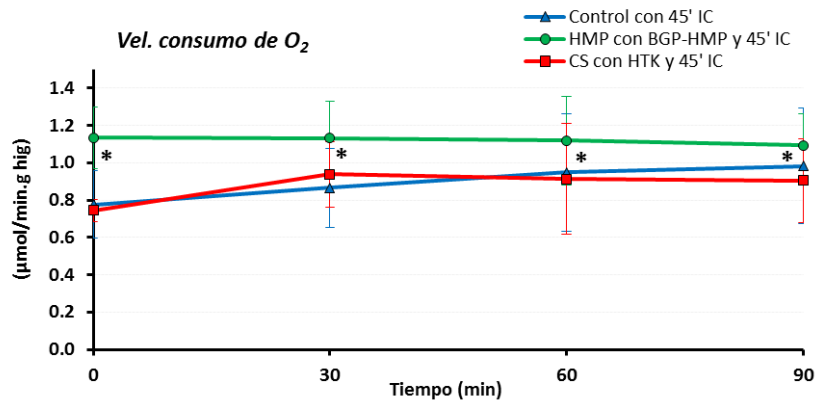


Figura 46. Velocidad de consumo de oxígeno durante los 90 min de reperusión en el IPRL. Cada punto denota la media \pm SD de 5 experimentos. * indica diferencia estadísticamente significativa entre el grupo HMP + BGP-HMP vs los otros grupos (SCS + HTK y control) para un $p < 0,05$.

Contenido de glucógeno

El contenido de glucógeno en el tejido hepático fue determinado para los tres grupos de hígados DCD post-reperusión normotérmica (Figura 47). En base a nuestros resultados, pudimos comprobar que, aunque el metabolismo es desacelerado en un factor de 1,5-2 por cada 10°C de descenso en la temperatura³⁰, aún subsiste una actividad metabólica basal con el consecuente consumo de las reservas de glucógeno en los hígados preservados en hipotermia (5°C). Durante la reperusión, el consumo se intensifica y las reservas son rápidamente derivadas a la vía glicolítica. Este hecho denota la necesidad de recurrir a estrategias para prevenir la depleción energética en la procuración de este tipo de órganos que han sufrido un período de IC.

Los hígados que han sido preservados durante 24 h muestran una disminución en la cantidad de reservas de glucógeno con respecto al grupo control sin preservar, sin embargo solo encontramos diferencias significativas para el grupo preservado por HMP. De la misma manera, entre los grupos preservados también existen diferencias, existiendo menos glucógeno en el grupo preservado de manera continua.

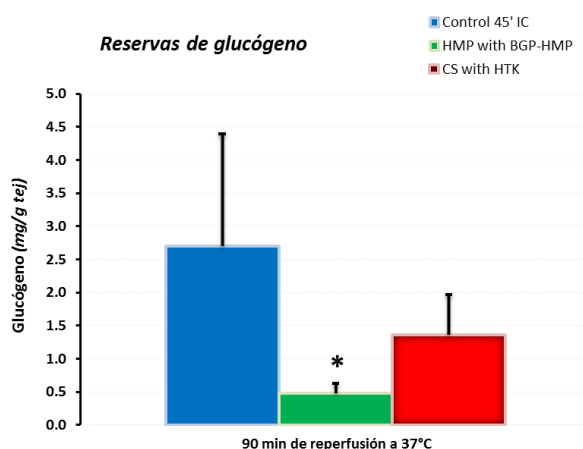


Figura 47. Contenido de glucógeno determinado en extractos hepáticos post-reperusión normotérmica. Cada columna denota la media \pm SD de 5 experimentos. * indica diferencia estadísticamente significativa respecto los demás grupos con $p < 0,05$.

Estudios histológicos post-reperfusión

Al finalizar los 90 minutos de perfusión normotérmica *ex vivo*, los hígados son desconectados del sistema IPRL para la toma de muestra de diferentes porciones del tejido. Tres de estas muestras son fijadas en formaldehído al 10% en PBS para luego ser procesadas y fijadas en un portaobjetos donde se llevó a cabo la tinción con Hematoxilina/Eosina. La primera tinción tiñe los núcleos celulares en tonos azul-violáceos debido a su fuerte interacción con los ácidos nucleicos, y la segunda tinción de contraste con eosina tiñe, en distintos tonos de color rosa, componentes del citoplasma y de la matriz extracelular.

En general, el parénquima hepático se mantuvo en buenas condiciones para todos los hígados post-reperfusión. Es posible apreciar la estructura conservada de los cordones hepatocitarios delineando los canales sinusoidales entre ellos; por otra parte, no se observó la presencia de núcleos picnóticos indicadores de muerte celular. Las venas centrales y espacios porta mostraron un alto grado de conservación en su morfología. Es de destacar, sin embargo, la presencia de células endoteliales de morfología alterada (redondeadas) y parcialmente desprendidas en la luz sinusoidal. Esto concuerda con trabajos previos donde se reportó que las células no parenquimatosas son el principal blanco de la injuria durante la fase de isquemia fría¹³³.

Para el estudio morfométrico (Figura 48) se eligieron tres signos de injuria que comúnmente se hallan en la histología de un hígado sometido a isquemia/reperfusión: vacuolización, dilatación sinusoidal y presencia de células endoteliales sueltas en los sinusoides. Los períodos de hipoxia, en combinación con una presión hidrostática elevada dentro del hígado, generan el desarrollo de vacuolas como consecuencia del influjo intracitoplasmático del plasma sinusoidal¹³⁴. Una elevada incidencia de vacuolas en el citoplasma de los hepatocitos, por lo tanto, sería indicio de daño celular. En nuestros grupos experimentales no se encontraron vacuolas en cantidad considerable, solamente en algunas pequeñas zonas aisladas como puede observarse en la figura 48 A. Por otro lado, al evaluar el tamaño de los sinusoides hepáticos notamos que el grupo preservado por HMP presentaba un grado ligeramente mayor ($p=0.06$) de dilatación sinusoidal, porcentaje cercano al 11% del total del área de parénquima hepático (Figura 48 B). Esto sugiere la posibilidad de un balance inadecuado de la presión hidrostática durante la perfusión a pesar de la presencia de polietilenglicol y la baja presión de perfusión. Como se mencionó anteriormente, encontramos incidencia de células endoteliales dañadas, en un porcentaje cercano al 4% para los hígados preservados por SCS y de 2% para aquellos perfundidos en la HMP ($p=0,03$) (Figura 48 C).

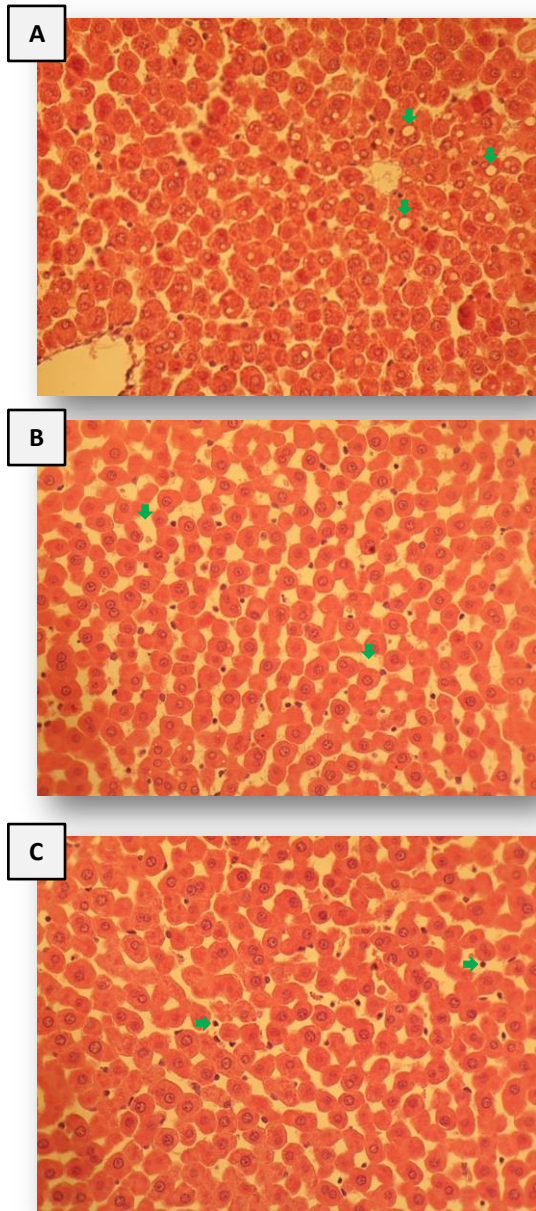
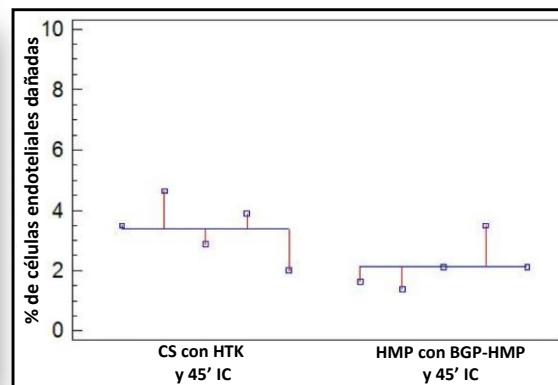
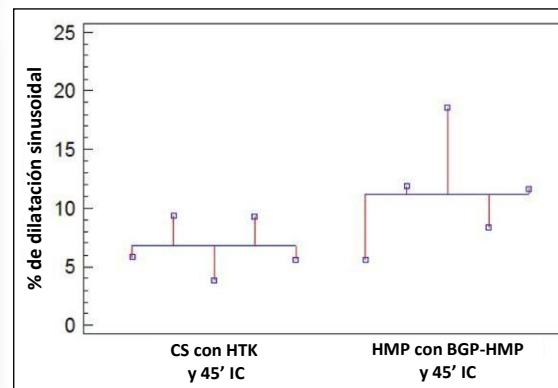


Figura 48. Tinción de hematoxilina/eosina.

Imágenes con una magnificación de 40× de biopsias teñidas con H&E. Las flechas muestran vacuolas citoplasmáticas (A), sinusoides dilatados (B) y células endoteliales dañadas (C). Las gráficas muestran los resultados del análisis morfométrico. Los valores porcentuales explican la frecuencia de ocurrencia del evento de lesión evaluado en cada experimento.



Resultados y discusión (HMP vs SCS con BGP-HMP y 45' IC)

Parámetros hemodinámicos (Figura 49)

En este caso, al evaluar las dos técnicas de preservación utilizando la misma solución de preservación (BGP-HMP), aplicadas al rescate de hígados DCD, ya no encontramos las diferencias estadísticas que si había cuando comparamos soluciones diferentes. De todas maneras se observa una clara tendencia indicando que los hígados preservados por HMP preservaron mejor su microvasculatura, con mejores parámetros hemodinámicos. Durante los 90 minutos de reperfusión el flujo de perfusión se mantuvo prácticamente constante en ambos grupos.

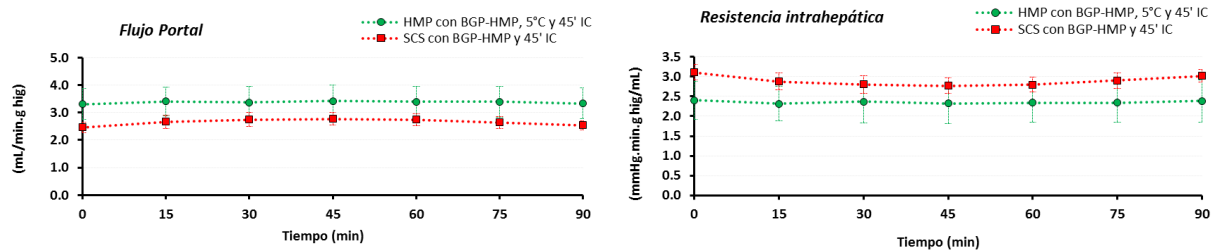


Figura 49. Evolución del **flujo de perfusión** y de la **resistencia intrahepática** durante los 90 min de reperfusión a 37°C. **Izquierda:** flujo portal de hígados DCD preservados por SCS o HMP con la solución BGP-HMP. **Derecha:** resistencia vascular ejercida por hígados DCD preservados por SCS o HMP con la solución BGP-HMP. Cada punto representa la media \pm SD para 5 experimentos. No se encontraron diferencias significativas ($p < 0,05$), pero se observa una clara tendencia a favor de los hígados preservados por HMP.

Liberación de enzimas citoplasmáticas (LDH y AST)

La liberación de LDH y de AST durante la reperfusión fue sostenida en el tiempo para ambas técnicas empleadas. De la misma manera que para los parámetros hemodinámicos, no se encontraron diferencias estadísticas entre los grupos tratados debido a la gran variación entre hígados, pero la tendencia marca mayor cantidad de enzimas citoplasmáticas acumuladas en los hígados preservados por SCS (Figura 50) (LDH: HMP $26,74 \pm 11,8$ vs SCS $47,26 \pm 21,11$; AST: HMP $5,07 \pm 2,57$ vs SCS $8,61 \pm 3,8$ en [U/L.g híg]).

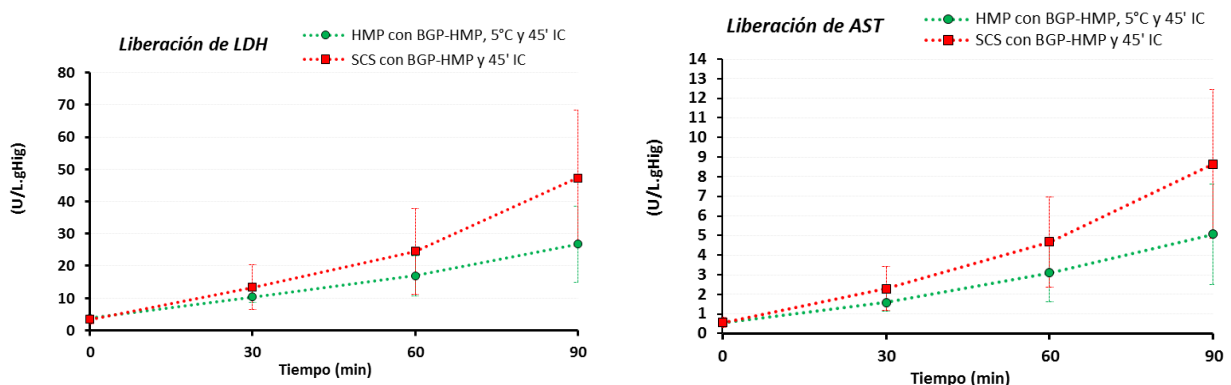


Figura 50. Liberación de enzimas hepáticas en la solución de preservación durante 90 min de reperfusión normotérmica. No se encontraron diferencias entre grupos. $n = 5$ / $*p < 0,05$

Consumo de oxígeno:

Durante el período de reperfusión a 37°C se midió la velocidad a la cual los hígados preservados consumen oxígeno (Figura 51). El consumo fue muy bueno para todos los órganos, encontrándose diferencias entre grupos. Aquellos preservados por HMP presentaron una mayor tasa respiratoria que los preservados por SCS con la misma solución.

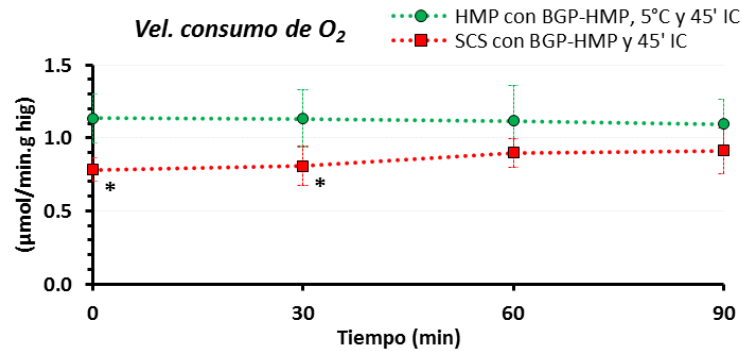


Figura 51. Consumo de O_2 durante los 90 min de perfusión a $37^\circ C$, luego de preservar hígados DCD por HMP o por SCS. Cada punto representa la media \pm SD para 5 experimentos. Los hígados preservados por HMP presentaron una tasa de consumo más elevada que los del grupo SCS ($p < 0,05$).

Actividad metabólica:

El contenido de glucógeno tisular de los hígados preservados por HMP se vio disminuido en relación a los del grupo SCS, resultado que concuerda con los obtenidos en el análisis con diferentes soluciones (Figura 52). Este resultado nos podría estar indicando que los hígados preservados por la vía dinámica necesitaron mayor cantidad de energía para reponerse de la injuria causada por la isquemia fría. Ante estas exigencias, el metabolismo catalítico de glucogenólisis se mantuvo activo; situación a destacar ya que el hígado fue capaz de reactivar su metabolismo de manera efectiva luego de ser preservado durante 24 h a $5^\circ C$.

La producción de bilis se evaluó a través del cálculo de la secreción biliar total durante los 90 min de perfusión (Figura 52). En este caso, nuevamente obtenemos una menor secreción biliar por la técnica de HMP, descartando un efecto de la solución de preservación y si atribuible a la técnica dinámica. La secreción biliar total ($\mu L/g$ hig) fue de $52,26 \pm 6,69$ para el grupo preservado por SCS y $15,55 \pm 15,23$ para aquellos preservados por HMP.

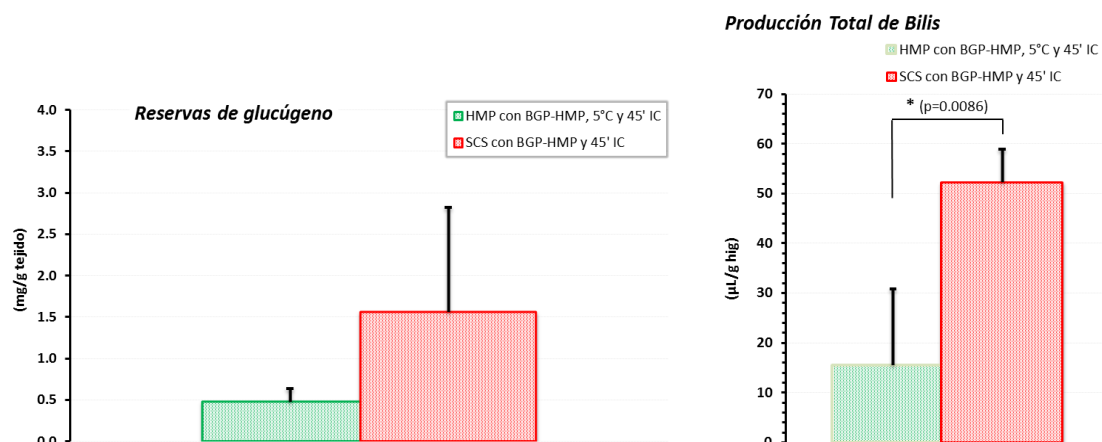


Figura 52. Actividad metabólica de los hígados preservados con BGP-HMP por medio de las dos técnicas de preservación estudiadas. Izquierda: **reservas de glucógeno** presentes en el tejido. Derecha: **secreción biliar** acumulada durante 90 min de perfusión a $37^\circ C$.

Conclusión parcial

En este apartado decidimos comparar la eficiencia de hígados provenientes de DCD que fueron preservados por la técnica HMP con nuestra solución de preservación BGP-HMP, frente a los resultados obtenidos para aquellos preservados por una técnica tradicional en la clínica médica y empleando una solución comercial ampliamente difundida. En lo que respecta a la integridad de la microcirculación pudimos observar que los hígados preservados por HMP mostraron una mejor respuesta hemodinámica, plasmada en la reducción de la resistencia intrahepática ejercida al flujo de perfusión, el que fue mayor para los hígados del grupo HMP + BGP-HMP. A su vez, estos hígados fueron capaces de mejorar la capacidad de consumo de O₂, incluso con respecto al grupo control. Estos resultados no son menores, ya que las alteraciones en la microcirculación hepática constituyen un factor determinante en el fallo primario post-trasplante, sobre todo en experiencias con donación a corazón parado¹⁸. Durante el fenómeno de isquemia, la depleción de sustratos energéticos produce edema en células de Kupffer y endoteliales; además, la pérdida del delicado equilibrio entre el óxido nítrico y la endotelina induce la vasoconstricción comprometiendo el flujo intrahepático y favoreciendo el reclutamiento de leucocitos¹³⁵. Por otro lado, los hígados preservados con ambos métodos de preservación mostraron la misma integridad de la membrana y fueron capaces de mantener un metabolismo activo. Podemos concluir que ambos sistemas de preservación de hígados podrían ser adecuados para ser aplicados bajo diferentes circunstancias con el fin de obtener un mejor uso de los hígados provenientes de DCD para aumentar el pool de órganos disponibles para trasplante.

Por otro lado, teniendo estos resultados en carpeta, decidimos seguir caracterizando nuestra solución de preservación y, preservar con ella, hígados provenientes de DCD por SCS. De esta forma podríamos atribuir los efectos encontrados a la solución o a la técnica, según sea el caso. En los parámetros hemodinámicos estudiados, a diferencia del estudio con SCS + HTK, no encontramos diferencia alguna; lo mismo ocurrió para la liberación de enzimas. El consumo de oxígeno sí resultó mejor para los hígados preservados por HMP, al igual que en el estudio previo (página 95); en tanto que la producción biliar otra vez fue inferior en los hígados perfundidos por HMP, lo que indica un efecto deletéreo de la técnica de HMP sobre ese carácter.

Estos resultados son los primeros indicios de que nuestra solución puede ser utilizada tanto en preservación dinámica como en estática, obteniendo resultados similares entre técnicas, pero superadores en relación a la solución HTK.

EXPERIENCIAS UTILZANDO LA SOLUCIÓN BGP-HMP PARA LA PRESERVACIÓN DE HÍGADOS DE RATA POR LA TÉCNICA DE SCS

Las soluciones de preservación "gold standard" que se utilizan en el trasplante de hígado mediante SCS son la UW y la HTK. Recientemente, ante la gran demanda de órganos y posibilidad de emplear aquellos denominados marginales, surgió la necesidad de contar con nuevas alternativas y se ha abierto el campo a nuevas soluciones como Celsior® e IGL-1®, pero aún no está claro sobre cuál garantiza mejores resultados a corto y largo plazo^{43,136,137}. Aunque hay una gran cantidad de proyectos

de investigación en marcha, todavía no se cuenta con la evidencia necesaria que apoye el desarrollo de nuevas alternativas, que no solo mejoren los resultados, sino que también permitan extender los tiempos durante el trasplante.

Por lo anteriormente mencionado, en este apartado nos planteamos como objetivo evaluar el rendimiento de nuestra nueva solución BGP-HMP aplicada a la preservación estática por SCS, y si es necesario, modificar su composición química para que pueda ser utilizada tanto en técnicas de preservación estática como así también dinámicas. Para lograr este objetivo comparamos nuestra solución BGP-HMP contra la comercial HTK mediante el uso de la técnica de SCS, IPRL y el trasplante hepático en rata.

Preservación por SCS: preservación de órganos DBD y DCD con la solución BGP-HMP

Protocolo experimental

Un grupo de hígados de ratas DBD y otro DCD fueron preservados por la técnica de SCS con nuestra solución de preservación BGP-HMP y posteriormente evaluados en el sistema IPRL. Estos grupos fueron comparados con un grupo de hígados DBD y otro DCD preservados también por SCS pero con la solución HTK. Como controles utilizamos hígados de ratas DBD y DCD procurados e inmediatamente reperfundidos en el sistema IPRL sin preservar (Figura 53).

Grupo experimental	Descripción
Control	Hígados aislados e inmediatamente reperfundidos <i>ex vivo</i> .
SCS BGP-HMP	Hígados aislados, preservados 24 h por SCS con solución BGP-HMP y reperfundidos <i>ex vivo</i> .
SCS HTK	Hígados aislados, preservados 24 h por SCS con solución HTK y reperfundidos <i>ex vivo</i> .
Control 45' IC	Hígados con 45 min de IC aislados e inmediatamente reperfundidos <i>ex vivo</i> .
SCS BGP-HMP y 45' IC	Hígados con 45 min de IC preservados 24 h por SCS con solución BGP-HMP y reperfundidos <i>ex vivo</i> .
SCS HTK y 45' IC	Hígados con 45 min de IC preservados 24 h por SCS con solución HTK y reperfundidos <i>ex vivo</i> .

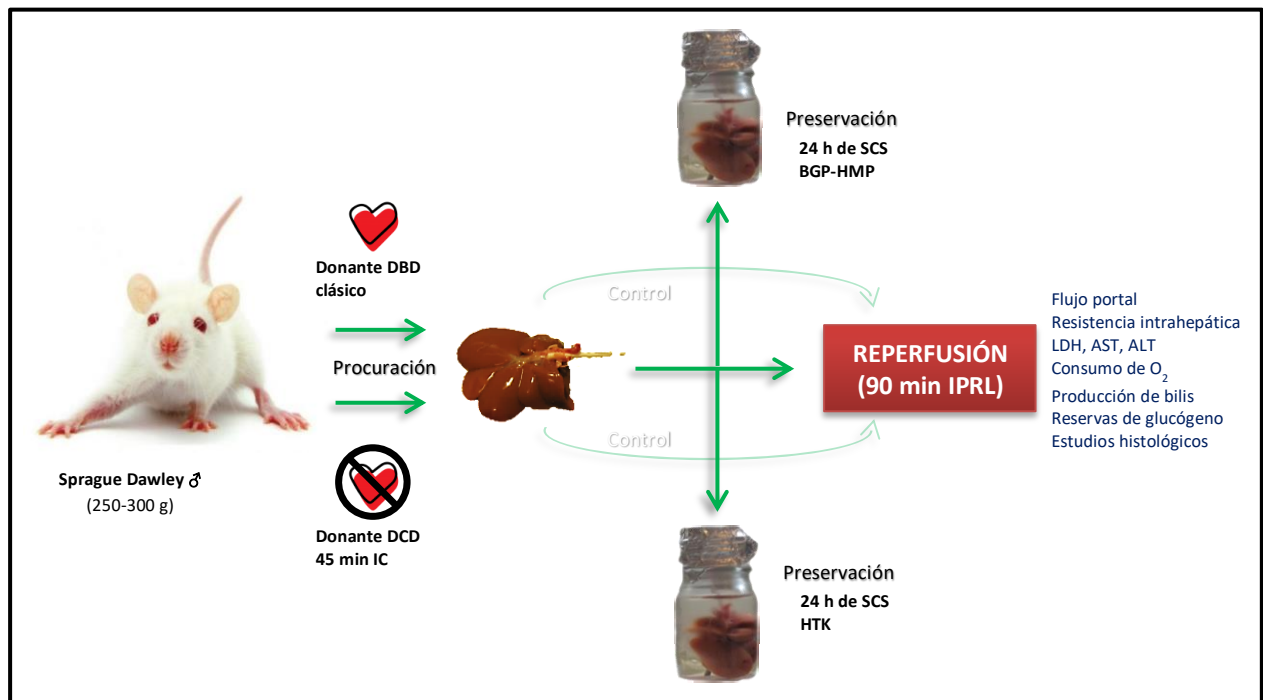


Figura 53. Diseño experimental para evaluar la solución de preservación BGP-HMP en la preservación estática por SCS.

Resultados y discusión

Liberación de enzimas citoplasmáticas (LDH)

Al evaluar la liberación de LDH en el perfusato durante la reperfusion normotérmica, y recordando que la presencia de las mismas indica daño celular, en los hígados provenientes de DBD pudimos encontrar diferencias estadísticamente significativas de ambos grupos con respecto al control (Figura 54). Al tiempo final el grupo HTK presentó más daño celular que el grupo BGP-HMP ($p < 0,05$).

Para el caso de hígados isquémicos (DCD), los preservados con HTK exhibieron mayor liberación de LDH que los controles a los tiempos 30 y 90 min (HTK $18,03 \pm 8,45$ y $97,29 \pm 20,40$ vs Control $9,52 \pm 3,73$ y $22,98 \pm 6,23$ respectivamente en [U/L.g hig]). BGP-HMP solamente se diferenció del control a los 60 min de reperfusion, no así al final del experimento. Entre ambas soluciones existieron diferencias en la liberación de LDH a los dos tiempos finales 60 y 90 min (BGP $24,48 \pm 13,27$ y $47,26 \pm 21,11$ vs HTK $36,83 \pm 10,07$ y $97,29 \pm 20,40$ respectivamente en [U/L.g hig]) sugiriendo que los hígados preservados con BGP-HMP presentaron menor daño por isquemia/preservación/reperfusion que los hígados preservados con HTK ($p < 0,05$).

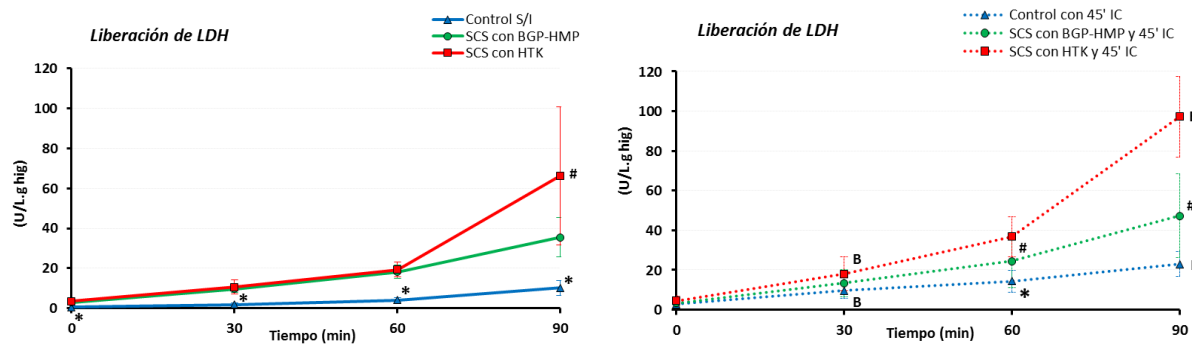


Figura 54. Liberación de LDH. Evolución de la cantidad de LDH liberada en el perfusato durante los 90 min de reperfusión a 37°C. **Izquierda:** grupos de hígados a partir de donantes sin IC. **Derecha:** grupos de hígados a partir de donantes con IC. Cada punto representa la media \pm SD para 5 experimentos.

* BGP-HMP y HTK son diferentes al control. # HTK es diferente a BGP-HMP.

A BGP es diferente al control. B HTK es diferente al control.

Flujo portal (Figura 55)

Durante la duración total de la reperfusión en normotermia (90 min) todos los hígados provenientes de donantes convencionales DBD mostraron un flujo portal muy bueno y constante, a excepción del grupo HTK. El mismo alcanzó un punto máximo a los 45 min ($2,47 \pm 0,22$ [mL/min.g híg]), posteriormente disminuyó hasta alcanzar el mínimo a los 90 min ($2,21 \pm 0,20$ [mL/min.g híg]) y la diferencia estadística con el grupo control ($p < 0,05$).

Por otro lado, entre los grupos de hígados DCD las diferencias en el flujo fueron mayores. Si bien ambos grupos de hígados preservados presentaron un flujo inferior al de los controles, el grupo HTK mostró valores muy inferiores al del grupo BGP-HMP (a los 90 min, BGP-HMP $2,54 \pm 0,17$ vs HTK $1,74 \pm 0,13$ en [mL/min.g híg]).

En base a los resultados obtenidos luego de la preservación por SCS durante 24 horas, la integridad microvascular de los hígados preservados con BGP-HMP se encuentra mejor preservada que la misma para aquellos preservados con la solución HTK.

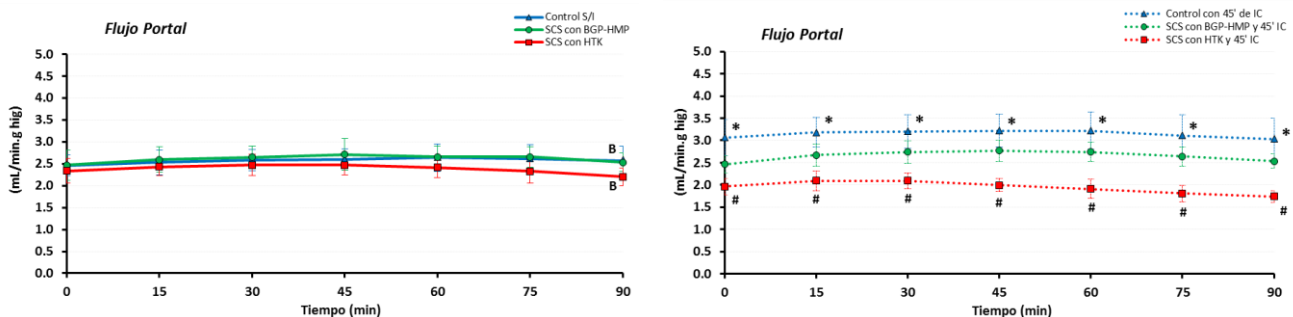


Figura 55. Evolución del flujo de perfusión durante los 90 min de reperfusión a 37°C. **Izquierda:** grupos de hígados a partir de donantes sin IC. **Derecha:** grupos de hígados a partir de donantes con IC. Cada punto representa la media \pm SD para 5 experimentos. Los hígados preservados con BGP-HMP presentaron mejores parámetros hemodinámicos que los del grupo HTK.

* BGP-HMP y HTK son diferentes al control. # HTK es diferente a BGP-HMP.

A BGP es diferente al control. B HTK es diferente al control.

Consumo de Oxígeno

Como medida de la actividad metabólica de los hígados preservados medimos la velocidad a la cual estos consumen oxígeno durante el período de reperusión normotérmica (Figura 56). Los grupos de hígados DBD y DCD presentaron tasas de consumo muy similares. Al evaluar los grupos **no isquémicos** podemos observar que los hígados del grupo BGP-HMP tuvieron idéntico consumo que los del grupo control sin preservar, no así los del grupo HTK en los que el consumo fue menor. Esta disminución del metabolismo oxidativo es aún más evidente en los hígados **isquémicos**, donde aquellos del grupo HTK consumieron menos oxígeno que los controles, y a los tiempos 60 y 90 min menos que los hígados del grupo BGP-HMP ($p < 0,05$). Los hígados preservados con nuestra solución BGP-HMP fueron capaces de captar más O_2 ($\mu\text{mol}/\text{min} \cdot \text{g}$ hígado) que los hígados preservados con HTK: $0,91 \pm 0,16$ vs. $0,58 \pm 0,1$ a tiempo final respectivamente.

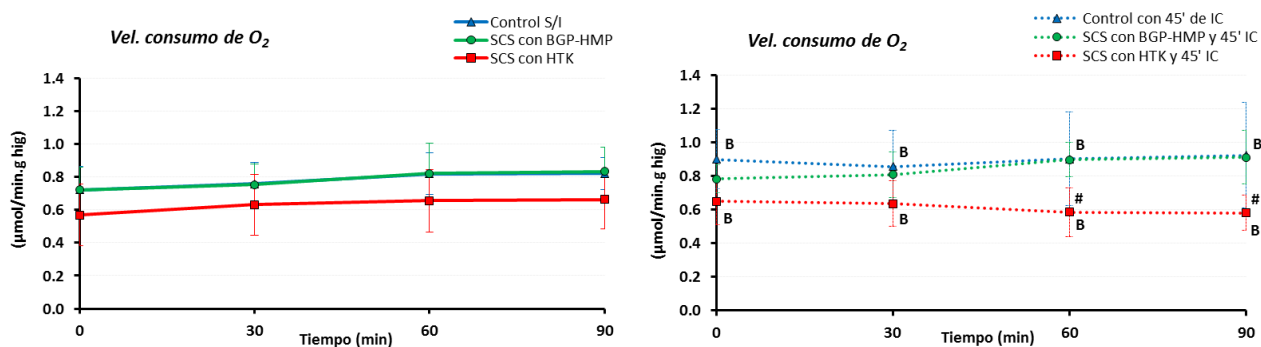


Figura 56. Evolución del **consumo de O_2** durante los 90 min de reperusión a 37°C. **Izquierda:** grupos de hígados a partir de donantes sin IC. **Derecha:** grupos de hígados a partir de donantes con IC. Cada punto representa la media \pm SD para 5 experimentos. Los hígados preservados con BGP-HMP presentaron una tasa de consumo más elevada que los del grupo HTK.

* BGP-HMP y HTK son diferentes al control. # HTK es diferente a BGP-HMP.

A BGP es diferente al control. B HTK es diferente al control.

Flujo biliar (Figura 57)

La función secretora del hígado fue evaluada de manera gravimétrica colectando muestras de bilis cada 15 min durante la totalidad del período de reperusión normotérmica. Al preservar los hígados de manera estática por SCS los mismos produjeron una buena cantidad de bilis. Tanto los hígados DBD como los DCD preservados produjeron menor cantidad que los hígados controles, pero es muy rescatable que los hígados isquémicos secretaron la misma cantidad que los no isquémicos, sugiriendo que el daño producido por la falta de oxígeno sobre las células del tracto biliar pudo ser revertido.

Otro punto interesante es que, en este caso, los hígados preservados con BGP-HMP produjeron la misma cantidad de bilis que aquellos del grupo HTK. Cabe recordar que cuando habíamos preservado con la HMP y solución BGP-HMP (ver página 94) la producción biliar había sido inferior que para los preservados por SCS y HTK; de esta manera, y sumado a los resultados obtenidos en la página 99 comparando las dos

técnicas con la misma solución (BGP-HMP), podemos descartar que éste efecto sea atribuible a la composición de la solución BGP-HMP, y si a la técnica de preservación.

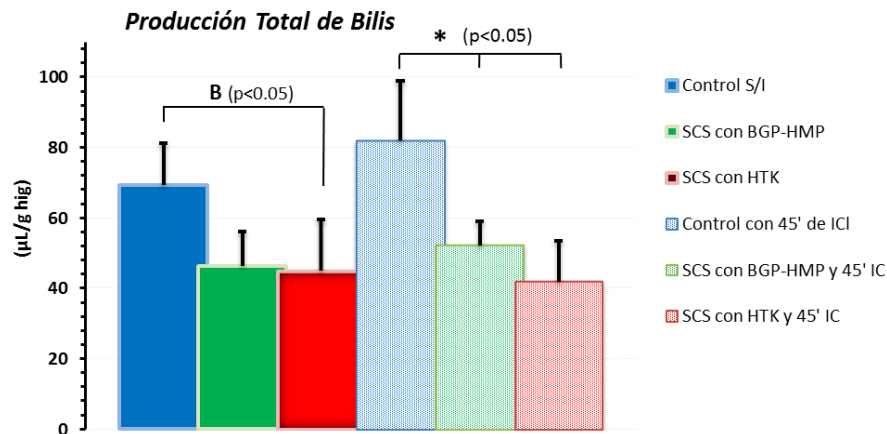


Figura 57. Cantidad total de **bilis secretada** durante los 90 min de reperusión normotérmica. Se encontraron diferencias significativas entre los grupos preservados y los controles sin preservar. * BGP-HMP y HTK son diferentes al control. B HTK es diferente al control para $p<0,05$.

Contenido de glucógeno

El contenido de glucógeno tisular de los hígados preservados se vio disminuido en relación a los controles (Figura 58). En particular los grupos preservados con la solución HTK lo hicieron en mayor medida que los de los grupos preservados con BGP-HMP. Probablemente, este agotamiento de las reservas energéticas es una respuesta a las altas demandas metabólicas durante la reperusión. Recordemos que durante la preservación por SCS los hígados sufren un período de hipoxia, por lo que, el metabolismo residual puede degradar glucógeno por la vía glucolítica. Una vez en el sistema IPRL los hígados cursan una etapa de estabilización donde requieren mucha energía para revertir el estado casi basal en el que se encontraban y poder así recuperar todas sus funciones ^{118,138}.

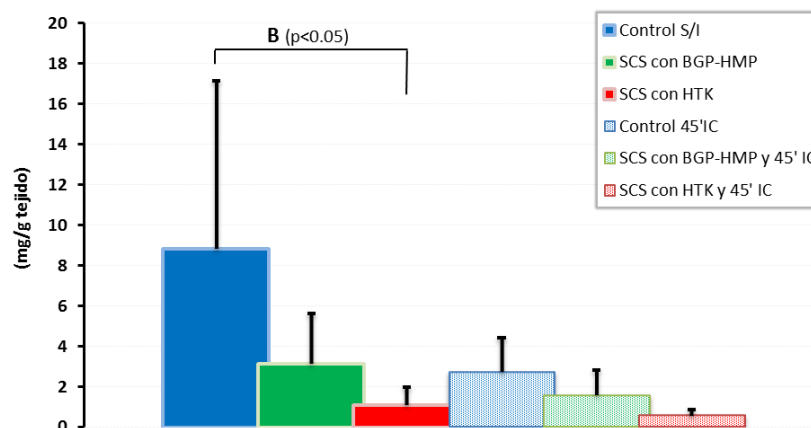


Figura 58. Reservas de **glucógeno** luego de 90 min de reperusión normotérmica. Se encontraron diferencias significativas entre el control sin isquemia y el grupo DBD preservado con HTK ($p<0,05$). Entre los grupos de órganos DBD y DCD no hubo diferencias en la cantidad de glucógeno almacenado en el parénquima hepático. B HTK es diferente al control.

Estudios histológicos post-reperfusión

La figura 59 muestra la histología representativa de hígados DBD control (panel **A**) o grupos tratados (**B** SCS con BGP-HMP, **C** SCS con HTK). Los grupos experimentales presentaron una histología bastante conservada con placas de hepatocitos organizadas; solo se observaron áreas necróticas/apoptóticas aisladas y tríadas portales bien estructuradas.

Dilatación sinusoidal: tanto en los hígados DBD como DCD se encontró mayor dilatación de los sinusoides en los grupos preservados que en los controles, sin diferencia entre los grupos BGP-HMP y HTK.

Lesión endotelial: las células endoteliales dañadas aparecen redondeadas y la mayoría de ellas sobresaliendo en la luz sinusoidal. Para los hígados sin isquemia DBD, la lesión fue más evidente en los hígados preservados ($p < 0,001$ frente a los controles), pero difirió entre las dos soluciones, siendo casi el doble en el grupo BGP-HMP. En los hígados DCD la lesión también fue mayor en los hígados preservados, pero sin diferencias entre los grupos BGP-HMP y HTK.

Presencia de vacuolas: una elevada incidencia de vacuolas en el citoplasma de los hepatocitos es signo de daño celular. Por lo general pudimos observar la incidencia de las mismas alrededor de las venas centrales con áreas portales sin vacuolas (acino de Rappaport, mayor cantidad de nutrientes en las zonas periportales). Para ambos tipos de donantes (DBD y DCD) los grupos preservados difieren del control, pero la vacuolización observada en los hígados preservados con HTK fue más elevada que la observada en el grupo BGP-HMP ($p < 0,001$).

Modelo de trasplante hepático heterotópico auxiliar y reducido de rata

Hasta el momento llevamos realizados diferentes tipos de estudios, todos ellos con la intención de abarcar la mayor cantidad de variables posibles en vistas de comprender los fenómenos de isquemia/reperfusión que acontecen durante las etapas del proceso de trasplante hepático. Diseñamos equipos, soluciones de preservación, probamos diversas técnicas de preservación y evaluamos los resultados *in vitro*. Pudimos recopilar una importante cantidad de datos, pero siempre llegamos a la conclusión, de que si bien nuestros esfuerzos conducen a resultados prometedores, nos falta completar el estudio por medio del trasplante hepático, evitando introducir sesgos en la investigación al no contar con la visión global del proceso mediante el estudio *in vivo*. Por lo tanto, para ampliar aún más nuestra comprensión de los fenómenos descritos y del rendimiento de nuestra solución de preservación, en esta parte del trabajo proponemos preservar hígados de rata por la técnica de SCS e implantarlos en ratas receptoras utilizando el modelo de trasplante heterotópico en la rata.

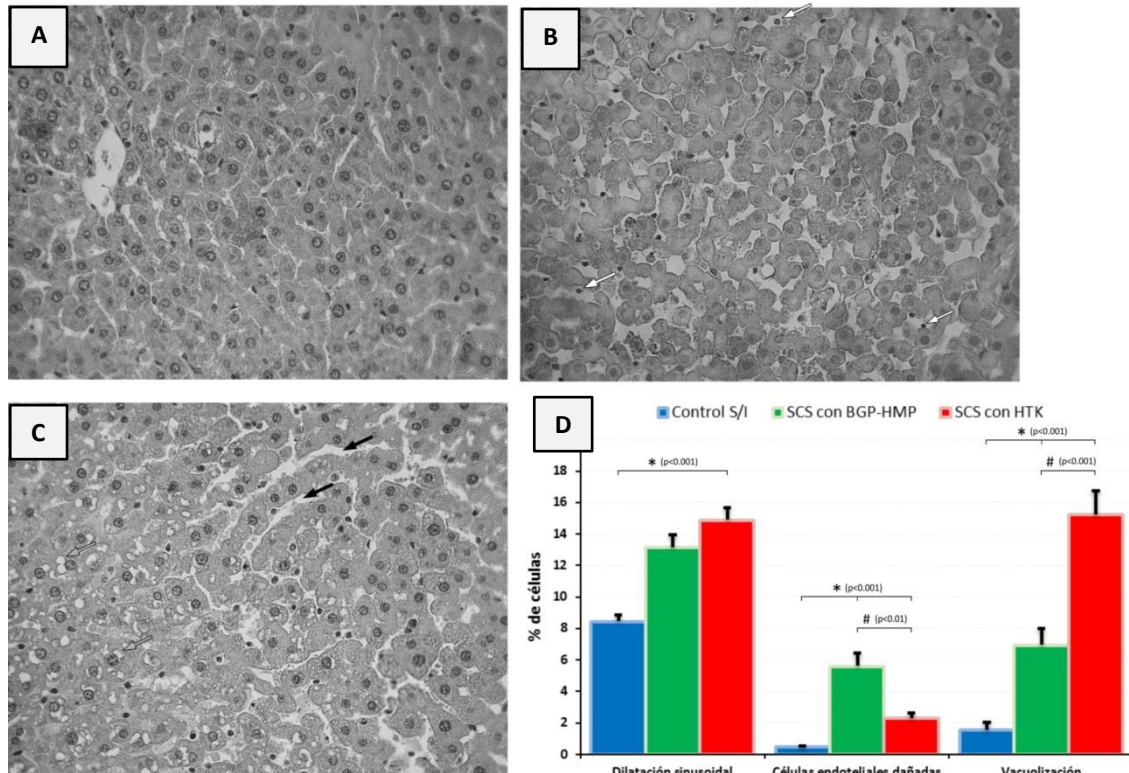
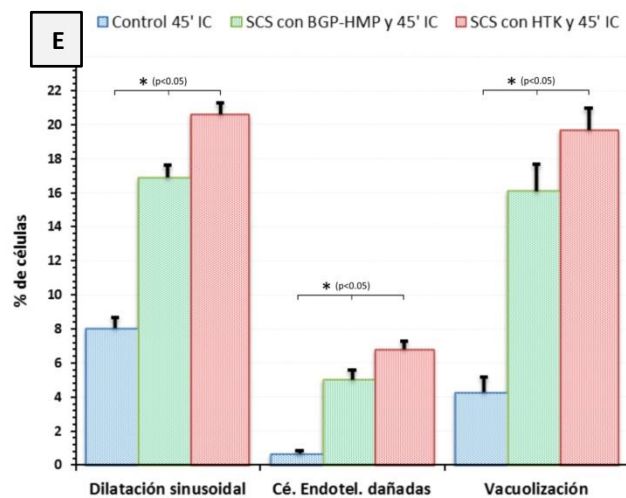


Figura 59. Biopsias de hígados teñidas con H/E luego de ser preservados durante 24 h y reperfundidos 90 min. Se muestran fotografías representativas (400x) utilizadas para realizar el análisis morfométrico. Las observaciones histopatológicas como la dilatación sinusoidal (flechas negras), citoplasma vacuolado (flechas grises) y células endoteliales dañadas (flechas blancas) fueron semi-cuantificadas por un método de puntuación. Los gráficos **D** y **E** muestran los resultados del análisis para los hígados DBD y DCD respectivamente. Los valores porcentuales de cada lesión estudiada se calcularon a partir de las frecuencias observadas en cada grupo experimental. **A)** Grupo control sin IC, **B)** Grupo BGP-HMP sin IC y **C)** Grupo HTK sin IC. * BGP-HMP y HTK son diferentes al control; # HTK es diferente a BGP-HMP.



Grupos experimentales

En esta etapa del trabajo se utilizaron 32 ratas. Cinco presentaron hemorragia interna en las anastomosis de la vena porta y no se consideraron, y se incluyeron tres ratas adicionales para obtener los datos de referencia. Doce ratas receptoras se dividieron aleatoriamente en dos grupos con 6 animales cada uno, considerando un tiempo de preservación corto (SPT) de $1 \pm 0,5$ h (tiempo mínimo entre la procuración y la implantación en el receptor) y un tiempo de preservación largo (LPT) de 24 ± 1 h

(Figura 60). Todas las ratas receptoras fueron sacrificadas 24 h después del desclampeo para evaluar los cambios patológicos de la lesión por isquemia-reperusión.

Grupo experimental	Descripción
HTK-SPT	Hígados aislados, preservados durante 1 h con solución HTK e implantados en ratas receptoras (n = 3).
HTK-LPT	Hígados aislados, preservados durante 24 h con solución HTK e implantados en ratas receptoras (n = 3).
BGP-SPT	Hígados aislados, preservados durante 1 h con solución BGP-HMP e implantados en ratas receptoras (n = 3).
BGP-LPT	Hígados aislados, preservados durante 24 h con solución BGP-HMP e implantados en ratas receptoras (n = 3).

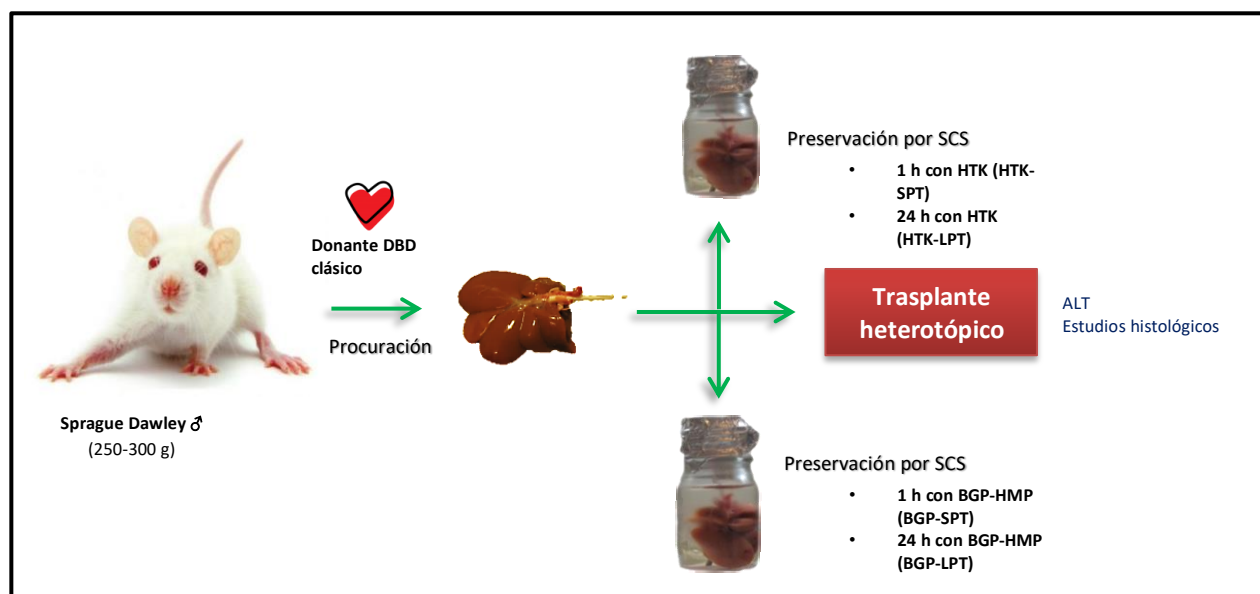


Figura 60. Diseño experimental para evaluar a la solución BGP-HMP en un modelo *in vivo*, trasplante hepático heterotópico en la rata.

Resultados y discusión

Liberación de enzimas citoplasmáticas: ALT

En la figura 61 podemos observar los niveles de enzima ALT que se midieron en muestras de sangre de las ratas receptoras de cada grupo estudiado, luego de 24 h de reperusión. El aumento de la concentración de estas enzimas en el plasma refleja el nivel de daño hepatocelular durante la etapa de reperusión de los órganos preservados y trasplantados. Los niveles de ALT en plasma fueron mayores para los grupos que recibieron hígados preservados durante 24 h (LPT) en relación a los preservados por un corto período (SPT). Luego de 24 h post-desclampeo no hubo diferencias significativas entre las dos soluciones evaluadas para ninguno de los dos tiempos de preservación estudiados. Podemos concluir que la cantidad de enzimas

citoplásmicas liberadas (ALT) fue la misma en hígados preservados con nuestra solución BGP-HMP que para los preservados con la solución comercial HTK.

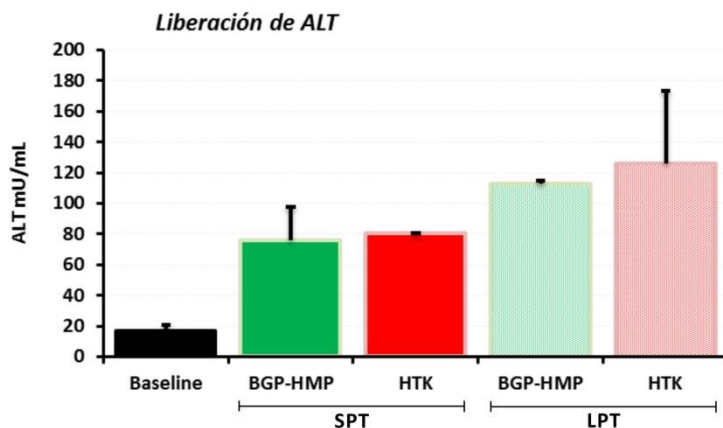


Figura 61. Niveles de **enzimas hepáticas** en plasma de ratas no trasplantadas y receptoras de hígados preservados SPT y LPT. No se observaron diferencias entre las ratas trasplantadas de cada grupo (* $p < 0,05$ todos los grupos frente a los datos de referencia).

Análisis histopatológico (Figura 62):

El daño hepático también fue evaluado histológicamente, según la clasificación de Abu Amara ¹²⁵. El análisis de las biopsias obtenidas después de un período corto de preservación (SPT) mostró lesión general en un rango entre 6-7. En estos grupos, la observación más común fue la vacuolización citoplásmica y un moderado grado de dilatación sinusoidal; sin diferencias entre los hígados preservados con las soluciones HTK y BGP-HMP. Cuando la preservación se extendió al tiempo extremo de 24 h (LPT), el grupo BGP-LPT mostró un grado moderado de daño histológico. Por otro lado, el grupo HTK-LPT mostró un mayor grado de lesión tisular ($p < 0,05$ frente a BGP-LPT), con severa y confluyente necrosis coagulativa, y hemorragia en los cordones hepáticos que conducen a la pérdida de la arquitectura del parénquima.

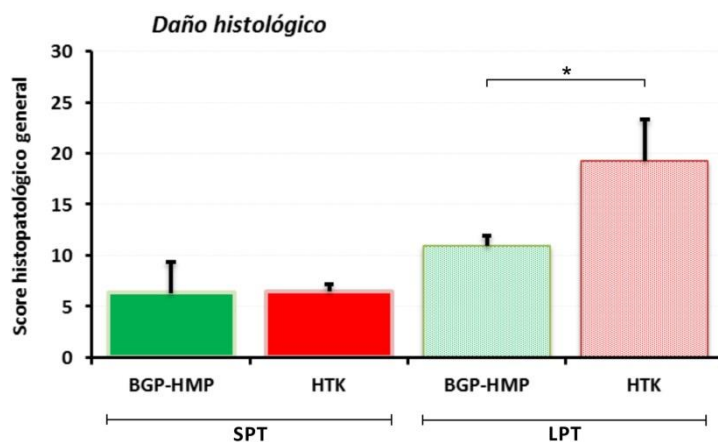


Figura 62. Puntuación **histopatológica general de los hígados trasplantados**. No se encontraron diferencias entre los grupos preservados durante un corto período de tiempo (1 h). Después de 24 h de preservación, el grupo HTK-LPT mostró un grado de lesión mucho mayor en comparación con el grupo BGP-LPT (* $p < 0,05$).
SPT: tiempo de preservación corto, **LPT:** tiempo de preservación largo.

Conclusión parcial

En el último apartado del trabajo nos propusimos evaluar el rendimiento de nuestra solución de preservación en hígados de rata por la técnica de SCS, con el objetivo de mejorar la performance obtenida con la solución comercial Custodiol®, ampliamente utilizada en la clínica. Recordemos que en Argentina y en casi todo el mundo, la técnica SCS es la más utilizada en la preservación hepática.

Los resultados obtenidos luego de la reperfusión normotérmica *ex vivo* fueron prometedores. Evaluamos el daño celular a través de la liberación de enzimas citoplasmáticas en el perfusato, que indican ruptura y muerte celular; los hígados preservados con la solución HTK mostraron mayor liberación de enzimas que los preservados con BGP-HMP. El análisis histológico a partir de fotografías fue otro parámetro de integridad celular que tuvimos en cuenta. En este caso, los grupos preservados mostraron mayor daño celular que aquellos no preservados, pertenecientes a los grupos controles. Entre los grupos preservados, los hígados HTK fueron los más lesionados, resultado que concuerda con el obtenido para la liberación de enzimas hepáticas.

A nivel de capacidad secretoria, los hígados preservados produjeron menos cantidad de bilis que aquellos que no han sido preservados, indicando que las vías biliares resultaron ser más propensas a sufrir daño por isquemia fría que otras células hepáticas. No encontramos diferencias entre las soluciones de preservación evaluadas. Las reservas de glucógeno se vieron disminuidas en relación a los controles, pero aquellos hígados que fueron preservados con BGP-HMP aún contenían más glucógeno que los de los grupos HTK. La actividad metabólica oxidativa fue evaluada a través de las tasas de consumo de oxígeno durante la reperfusión en normotermia. En los hígados DBD observamos que los preservados con BGP-HMP consumieron exactamente lo mismo que los controles, no así los preservados con HTK; en cambio, en los hígados DCD notamos una disminución del consumo, sobre todo en los preservados con HTK.

Un parámetro de integridad muy importante, donde obtuvimos buenos resultados, fue en la respuesta hemodinámica de los hígados preservados durante el período de IPRL. Al evaluar los hígados provenientes de donantes convencionales sin isquemia (DBD), aquellos preservados se comportaron de la misma manera que los controles. Cuando pasamos a los hígados isquémicos, en cambio, los preservados con HTK soportaron menor cantidad de flujo, por lo que el grupo BGP-HMP conservó la integridad vascular de mejor manera.

En una segunda etapa decidimos preservar hígados de rata y luego trasplantarlos para así concretar la evaluación en un modelo *in vivo*, análisis indispensable para tener una visión más holística de los mecanismos de isquemia y reperfusión. Preservamos hígados con las soluciones BGP-HMP y HTK, a su vez evaluamos dos tiempos de preservación diferentes. Cuando medimos la liberación de enzimas luego de 24 h post-desclampeo, no encontramos diferencias significativas entre las soluciones de preservación. Además, y más importante que la evaluación bioquímica, el análisis histopatológico, después de 24 h de preservación (hígados preservados a largo plazo) mostró que los hígados del grupo BGP-HMP tienen un menor grado de lesión tisular con ausencia de daño histológico irreversible, caracterizado por la ausencia de necrosis de hepatocitos, observada en el grupo HTK.

Después de probar nuestra nueva solución BGP-HMP en dos modelos, utilizando el modelo *in vitro* IPRL y el modelo de trasplante, los resultados respaldan un papel prometedor en la prevención de lesiones por isquemia-reperfusión en comparación con una de las soluciones de preservación clínicamente más utilizadas. Sin embargo, somos conscientes que el modelo de trasplante utilizado tiene algunas limitaciones, ya que las ratas receptoras conservan su hígado nativo. El trasplante ortotópico de hígado en la rata es el modelo ideal e indispensable para la investigación de trasplantes; sirve para estudiar nuevas técnicas de preservación y evaluar nuevas soluciones de preservación de órganos ^{122,123,139}. Esta técnica sigue siendo un modelo más difícil en comparación con otros métodos experimentales de trasplante en roedores, principalmente para lograr una tasa de supervivencia aceptable. Nuestro grupo cuenta con profesionales capacitados para lograr aplicar esta técnica ¹⁴⁰, pero durante el transcurso de ésta tesis se hizo muy difícil poder reproducirla. Por lo anteriormente mencionado es que optamos por emplear el modelo de trasplante heterotópico de hígado, que también es una buena herramienta, complementaria a los resultados *ex vivo* de injurias por isquemia-reperfusión.

DISEÑO DE UN SISTEMA DE PERFUSIÓN HIPOTÉRMICA PORTÁTIL Y AUTÓNOMO

El sistema portátil de perfusión hipotérmica (pHMP: portable hypothermic machine perfusion) mantiene las características principales de la máquina de perfusión ya descrita, agregando ciertas soluciones tecnológicas que le proveen autonomía y portabilidad al sistema. Inicialmente el pHMP se planteó como una necesidad para realizar experimentos de perfusión fuera del laboratorio donde se desarrolló la máquina de perfusión; ante la dificultad logística de trasladar todo el equipamiento necesario surgió la posibilidad de construir un sistema portátil. Así mismo, se propuso la automatización de todas las funciones de control con el objetivo de reducir la interferencia del operador sobre los resultados experimentales. Otra característica superadora es que permitiría llevar al quirófano el contenedor primario, y realizar el montaje del hígado en el mismo momento de la procuración, sin necesidad de trasladar el injerto de una sala a otra, por lo que mejoraría no solamente la operatividad sino también las condiciones de higiene. Por último, se consideró la posibilidad de una total autonomía energética que permitiera el traslado de un sitio a otro de un órgano mientras está siendo preservado por perfusión hipotérmica.

El sistema propuesto está compuesto por un contenedor primario que sostiene al órgano dentro de un contenedor secundario, el cual almacena la solución de preservación (Figura 63). De esta manera el órgano se encuentra continuamente sumergido en la solución de preservación, la cual circula a través de un circuito impulsado por una bomba peristáltica de perfusión. La solución es oxigenada mediante el burbujeo permanente de aire por medio de una bomba.



Figura 63. Contenedor primario (blanco) y contenedor secundario (azul), junto con la llave de 3 vías necesaria para el montaje del órgano.

El circuito de perfusión contiene a su vez, una derivación para la medición en tiempo real de la presión de perfusión, utilizando un sensor de presión sanguínea (*BLOOD PRESSURE TRANSDUCER – BLPR – World Precision Instrument, Inc*), un dispositivo atrapa burbujas y un filtro de partículas (Figura 64).

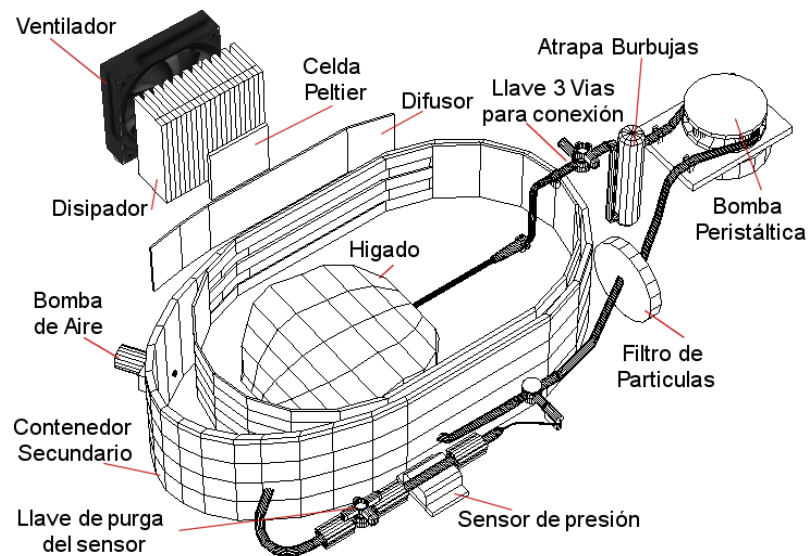


Figura 64. Circuito de perfusión. El contenedor primario se esquematizó a tamaño reducido para poder diferenciarlo del contenedor secundario.

La temperatura de la solución de preservación es controlada mediante un sistema de enfriamiento basado en dispositivos peltier y un sensor de temperatura del tipo termistor. La señal de este último es utilizada por el controlador central del sistema (basado en tecnología Arduino) para, mediante algoritmos de control del tipo PID (proporcional + integral + derivativo), mantener la solución de preservación a una temperatura definida por el operador. El sistema de enfriamiento activo (celda peltier) está apoyado por un sistema estático sin control, con el objetivo de reducir la carga de trabajo de la celda y así disminuir el consumo eléctrico de la misma. Esto se logra

mediante la utilización de un pack eutéctico, enfriado previamente a -20°C y en contacto con el recipiente secundario.

La perfusión se impulsa mediante una bomba peristáltica construida a partir de un motor paso a paso. Esto permite obtener una relación constante entre velocidad de rotación de la bomba y flujo de perfusión, siempre que se trabaje dentro de rangos de presión previamente determinados (Figura 65 A). De esta manera, y en base al monitoreo constante de la presión de perfusión es posible ajustar y controlar de manera permanente la velocidad de rotación de la bomba peristáltica, garantizando así una presión de perfusión constante (Figura 65 B). Esta combinación de bomba de flujo ajustable y sensor de presión permite a su vez, calcular en tiempo real la resistencia intravascular, parámetro hemodinámico fundamental para la evaluación de la calidad de la preservación.

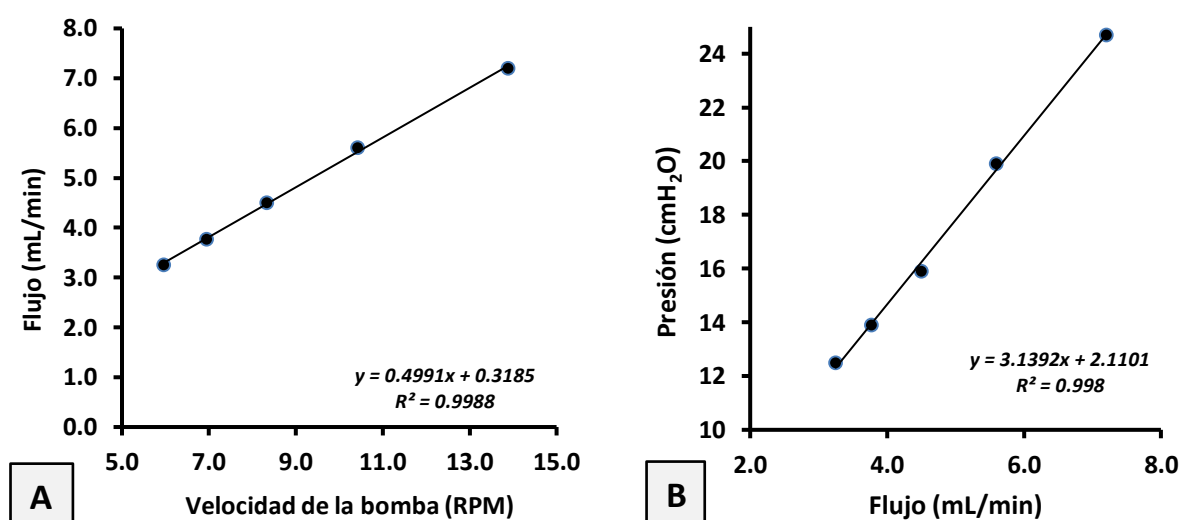


Figura 65. En la figura **A** se observa la relación lineal entre la velocidad de la bomba y el flujo, en un rango de presiones entre 12 y 24 cmH₂O. En la figura **B** se muestra como mediante el control del flujo puede controlarse la presión de perfusión. Resultados obtenidos en un sistema de resistencia constante (información no publicada).

Por último el controlador central posee una interface con el operador que consta de un display LCD donde se muestran los parámetros programados y las condiciones de temperatura, presión, flujo y resistencia intrascular. Presenta, a su vez, un teclado que permite programar y alterar las condiciones deseadas, permitiendo que el operador realice modificaciones sobre el programa de control ante eventuales necesidades.

En la figura 66 se puede ver el diseño completo en 3D del equipo de perfusión portátil, y en la figura 67 se presenta un despiece completo para observar todas las partes en detalle.

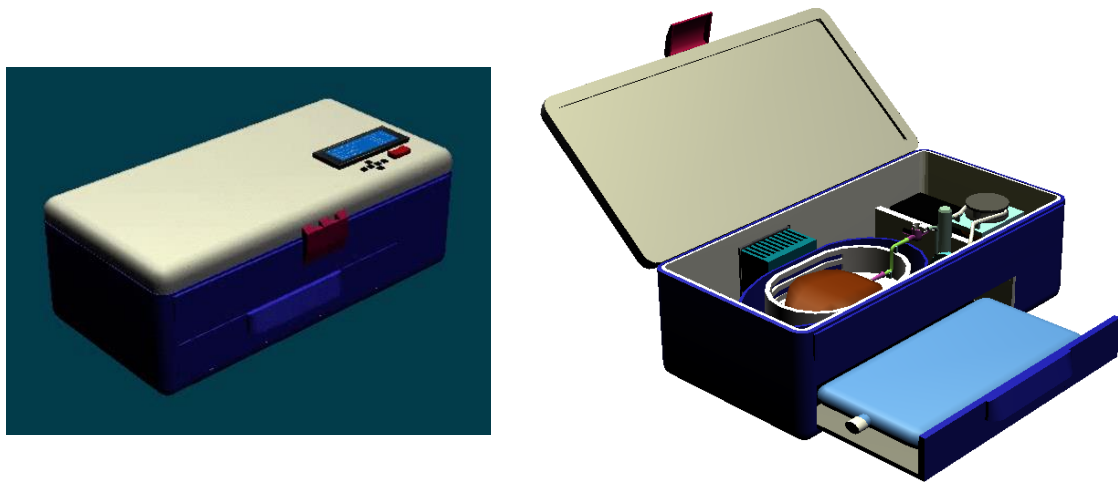


Figura 66. El diseño del equipo se realizó mediante tecnología CAD (*computer assisted design*), la cual no solo permite evaluar diferentes soluciones, sino que a su vez, constituye el primer paso para la fabricación de los componentes necesarios mediante impresión 3D.

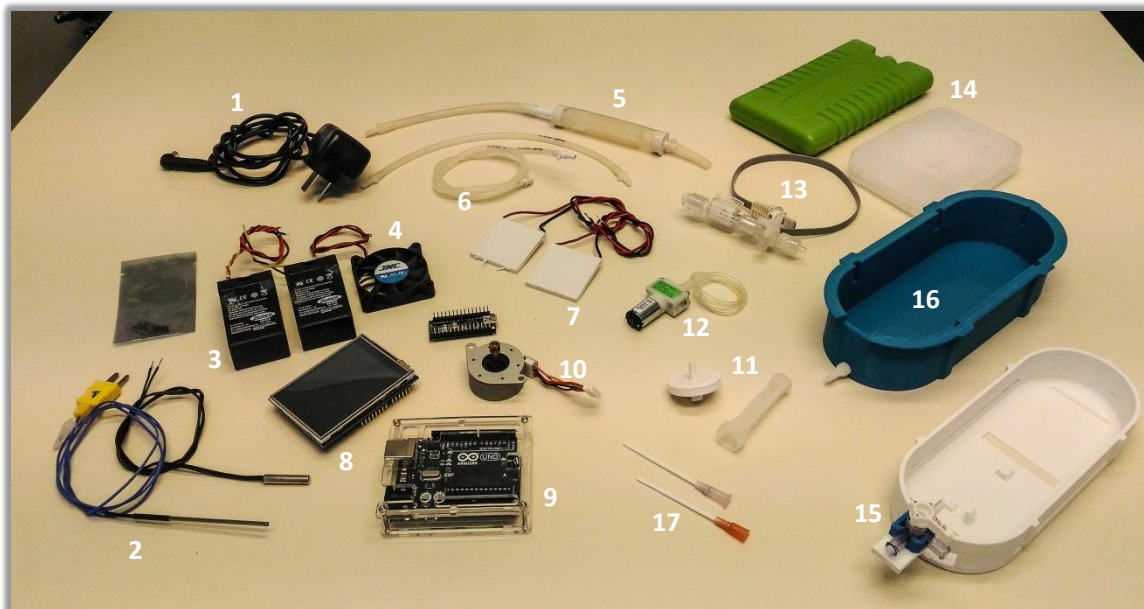


Figura 67. Piezas que componen al sistema pHMP. 1) Fuente de alimentación 2) Termistores para medir la temperatura 3) Baterías 4) Forzador de aire para disipación del sistema peltier 5) Atrapa burbujas 6) Tuberías Masterflex 7) Celdas peltier 8) Display LCD 9) Controlador central Arduino 10) Motor paso a paso 11) Filtros de partículas 12) Bomba de aire 13) Sensor de presión Blood pressure transducer 14) Placas eutécticas para enfriamiento pasivo 15) Contenedor primario con llave de 3 vías 16) Contenedor secundario y reservorio de sol. de preservación 17) Catéteres 14G Abbocath para perfusión por vena porta.

Al momento de escritura de la presente tesis, el sistema se encuentra en proceso de impresión de las piezas, y en el diseño y construcción de los circuitos electrónicos necesarios para la interface entre los sensores (sensor de presión y temperatura), el procesador central y los distintos actuadores (celda peltier y bomba de perfusión).

CONCLUSIONES

Si tú me dieras

*Los órganos son imperios
que nadie tiene recambio,
si tú no puedes usarlos
piensa, si quieres donarlos.*

*Ellos seguirán latiendo,
en cuerpos recomendados,
donde llegarán corriendo
para ser ya, trasplantados.*

*Tu decisión, es importante,
tú salvarás los órganos
y si necesitas trasplante,
alguien te dará sus manos.*

Antonia Navarrete Lebrato

CONCLUSIONES

- Logramos diseñar un prototipo de máquina de perfusión hipotérmica para hígados de rata. Avanzamos en la concreción de un modelo portátil y autónomo, hasta el momento de la entrega de este manuscrito nos vimos imposibilitados de concluirlo debido a que demoramos un tiempo en conseguir los sensores específicos que están disponibles únicamente en el exterior.
- Se caracterizó fisicoquímicamente la solución de preservación de órganos BGP-HMP desarrollada en nuestro laboratorio. Se determinaron la capacidad buffer, el punto de congelamiento, la solubilidad del oxígeno a diferentes temperaturas, la viscosidad y la presión coloidesmótica a diferentes temperaturas y a concentraciones crecientes de dos agentes coloides diferentes (PEG 35K y HES).
- Se lograron preservar hígados de rata por HMP a diferentes temperaturas y así determinar que 5°C sería la temperatura escogida para los sucesivos experimentos de preservación.
- Pudimos preservar por primera vez, con la solución BGP-HMP, hígados de rata por perfusión hipotérmica. Los mismos presentaron una mejor integridad de membrana y un menor daño por preservación/isquemia/reperfusión que los preservados con HTK. La capacidad de consumo de O₂ también se vio aumentada.
- Se lograron preservar y rescatar órganos provenientes de ratas a corazón no batiente DCD. Al compararlos con los resultados obtenidos para aquellos preservados por SCS y solución Custodiol® notamos que los hígados preservados por HMP mantuvieron el metabolismo activo, mostraron una respuesta hemodinámica superior y fueron capaces de aumentar su velocidad de consumo de O₂.
- Empleamos nuestra solución BGP-HMP en la preservación por SCS, y se lograron preservar hígados isquémicos, mostrando resultados superadores sobre los preservados con la solución comercial HTK.
- Se puso a punto el modelo de trasplante heterotópico auxiliar y reducido con arterialización de la vena porta. Preservamos hígados de rata pos SCS con las soluciones HTK y BGP-HMP, los cuales fueron trasplantados posteriormente. El daño generado luego de 24 horas post-desclampeo fue menor en los hígados preservados con la solución BGP-HMP. Esto significó la primer prueba *in vivo* de la preservación de hígados con la solución BGP-HMP.

Consideraciones finales

Los resultados obtenidos con la HMP fueron satisfactorios, pero a su vez consideramos que debemos seguir profundizando en los fenómenos de isquemia y reperfusión, para mejorar el estado de los hígados DCD y poder emplearlos como donantes en los procedimientos de trasplantes. Como punto débil de la técnica encontramos la imposibilidad de trasladar la máquina hasta no poder concretar el modelo portátil, situación que impidió la realización de mayor cantidad de experiencias de trasplantes en rata. Cabe recordar que dichos experimentos fueron realizados en colaboración con colegas de la Facultad de Ciencias Médicas de la UNLP y del Hospital Universitario Fundación Favaloro.

Otro punto a seguir consistió en la disminución en la secreción biliar, atribuible a la técnica de preservación. Para avanzar en este aspecto consideramos la posibilidad de hacer estudios de integridad estructural, por medio de técnicas de inmunohistoquímica con anticuerpos para proteínas estructurales de las vías biliares, como son la claudina ZO-1 y la ocludina. Para lograr estrategias de preservación más efectivas se requieren de acciones específicas durante las diferentes fases del proceso del trasplante, pero las condiciones óptimas sólo pueden alcanzarse una vez que los mecanismos de injuria a nivel celular y molecular sean interpretados. En nuestro caso creemos que en una próxima instancia debemos evaluar los efectos de la perfusión hipotérmica sobre la injuria por I/R mediante la utilización de algunos marcadores moleculares de daño por reperfusión en hígados preservados mediante esta técnica. Algunos de ellos podrían ser el factor Inducible por Hipoxia (HIF-1), el principal factor de transcripción responsable de la adaptación de los tejidos a la isquemia y a la privación de oxígeno; y el Factor de Necrosis Tumoral (TNF- α), producido por las células de Kupffer activadas, es un potente regulador de los daños producidos por la isquemia y reperfusión en los órganos para trasplante ¹⁴¹.

En lo que se refiere a la performance de nuestra solución BGP-HMP, llegamos a un punto de avance importante donde se hace indispensable evaluarla en modelos animales más grandes, con trasplantes de hígado completos y a tiempos de supervivencia más largos, como paso preliminar para los ensayos clínicos. Lo ideal sería pasar a un modelo porcino donde la realización de los trasplantes ortotópicos no sea tan complejo y dispongamos de la práctica ofrecida por los estudiantes de veterinaria con los que trabajamos en colaboración. Un anhelo que tenemos desde que iniciamos con las experiencias con la solución BGP-HMP es lograr que la misma se convierta en una alternativa a las soluciones comerciales. Nuestra solución de preservación es factible de ser preparada en cualquier laboratorio o farmacia de hospital, y en caso de poder avanzar con los pasos previos a la implementación clínica, podría convertirse en una buena oportunidad para que nuestro sistema nacional de procuración y trasplantes pueda independizarse de proveedores internacionales y ahorrar mucho dinero. Como mencioné anteriormente, para lograrlo necesitamos continuar avanzando en el estudio con animales más grandes o hígados de descarte, como así también en realizar modificaciones para que pueda ser empleada en la preservación de otros órganos abdominales. Al respecto ya estuvimos trabajando y se publicaron los primeros resultados (Vecchio Dezillio L., Carnevale M.E., Stringa P., Lausada N., Guibert E.E., Rumbo M., Tiribelli C., Gondolesi G., Rodríguez J.V. *“Evaluación de una nueva solución de preservación (BGP-HMP) de desarrollo nacional en un modelo experimental de trasplante de intestino”*).

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS



REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. **Sibulesky, L.** Anatomía normal del hígado. *Clin. Liver Dis.* 2, S61Š-S63Š (2013).
2. **Treyer, A. & Müsch, A.** Hepatocyte polarity. *Compr. Physiol.* 3, 243–87 (2013).
3. **Cingolani, H. E. & Houssay, A. B.** *Fisiología humana*. (El Ateneo, 2000).
4. **Grisham, J. W.** Organizational Principles of the Liver. in *The Liver* 1–15 (John Wiley & Sons, Ltd). doi:10.1002/9780470747919.ch1
5. **Rappaport, A. M.** The structural and functional unit in the human liver (liver acinus). *Anat. Rec.* 130, 673–89 (1958).
6. **Villegas-Serrano, E. Y. et al.** *Revista de la Facultad de Medicina de la Unam. Revista de la Facultad de Medicina (México)* 60, (AMERBAC, 2017).
7. **McCuskey, R. S.** The hepatic microvascular system in health and its response to toxicants. *Anat. Rec. (Hoboken)*. 291, 661–71 (2008).
8. **Linden, P. K.** History of solid organ transplantation and organ donation. *Crit. Care Clin.* 25, 165–84, ix (2009).
9. **Arjan van der Plaats.** The Groningen Hypothermic Liver Perfusion System for Improved Preservation in Organ Transplantation. (University of Groningen, 2005).
10. **Korontzi, M. I. et al.** Redox state and the potential role of antioxidant compounds in liver ischemia/reperfusion injury. *Int. J. Med. Med. Sci.* 2, 200–209 (2010).
11. **Guibert, E. E. et al.** Organ Preservation: Current Concepts and New Strategies for the Next Decade. *Transfus. Med. Hemother.* 38, 125–142 (2011).
12. **Guan, L.-Y. et al.** Mechanisms of hepatic ischemia-reperfusion injury and protective effects of nitric oxide. *World J. Gastrointest. Surg.* 6, 122 (2014).
13. **Sastre, J. et al.** Mitochondrial function in liver disease. *Front. Biosci.* 12, 1200–9 (2007).
14. **Glantzounis, G. K., Salacinski, H. J., Yang, W., Davidson, B. R. & Seifalian, A. M.** The contemporary role of antioxidant therapy in attenuating liver ischemia-reperfusion injury: a review. *Liver Transpl.* 11, 1031–47 (2005).
15. **Zhou, W. et al.** Subcellular site of superoxide dismutase expression differentially controls AP-1 activity and injury in mouse liver following ischemia/reperfusion. *Hepatology* 33, 902–14 (2001).
16. **Ke, B. et al.** KEAP1-NRF2 complex in ischemia-induced hepatocellular damage of mouse liver transplants. *J. Hepatol.* 59, 1200–7 (2013).
17. **Miyata, T., Takizawa, S. & van Ypersele de Strihou, C.** Hypoxia. 1. Intracellular

- sensors for oxygen and oxidative stress: novel therapeutic targets. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 300, C226-31 (2011).
18. **Monbaliu, D. et al.** Liver transplantation from non-heart-beating donors: current status and future prospects in an experimental model. *Acta Chir. Belg.* 108, 45–51
19. **Monbaliu, D., Pirenne, J. & Talbot, D.** Liver transplantation using Donation after Cardiac Death donors. *J. Hepatol.* 56, 474–85 (2012).
20. *Comisión de selección y mantenimiento del donante de órganos. Manual diciembre 2005.*
21. **Snell, G. I., Levvey, B. J. & Williams, T. J.** Non-heart beating organ donation. *Intern. Med. J.* 34, 501–503 (2004).
22. **Starzl, T. E. et al.** Homotransplantation of the liver in humans. *Surg. Gynecol. Obstet.* 117, 659–76 (1963).
23. **Dutkowski, P., de Rougemont, O. & Clavien, P.-A.** Machine Perfusion for ‘Marginal’ Liver Grafts. *Am. J. Transplant.* 8, 917–924 (2008).
24. **van der Plaats, A. et al.** Hypothermic machine preservation in liver transplantation revisited: concepts and criteria in the new millennium. *Ann. Biomed. Eng.* 32, 623–31 (2004).
25. **Thuong, M. et al.** New classification of donation after circulatory death donors definitions and terminology. *Transpl. Int.* 29, 749–59 (2016).
26. **Bernat, J. L. et al.** Report of a National Conference on Donation after Cardiac Death. *Am. J. Transplant.* 6, 281–291 (2006).
27. **Perera, M. T. P. & Bramhall, S. R.** Current status and recent advances of liver transplantation from donation after cardiac death. *World J. Gastrointest. Surg.* 3, 167 (2011).
28. **A. Petrenko, M. Carnevale, A. Somov, J.S. Osorio, J.V.Rodriguez, E.E. Guibert, B. Fuller, F. F.** Organ Preservation into the 2020s: the Era of Dynamic Intervention. *Transfus. Med. Hemotherapy* (2019).
29. **Fuller, B., Froghi, F. & Davidson, B.** Organ preservation solutions: linking pharmacology to survival for the donor organ pathway. *Curr. Opin. Organ Transplant.* 23, 361–368 (2018).
30. **Belzer, F. O. & Southard, J. H.** Principles of solid-organ preservation by cold storage. *Transplantation* 45, 673–6 (1988).
31. **Bessems, M., Doorschodt, B. M., Hooijschuur, O., van Vliet, A. K. & van Gulik, T. M.** Optimization of a new preservation solution for machine perfusion of the liver: which is the preferred colloid? *Transplant. Proc.* 37, 329–31 (2005).
32. **Fuller, B. J. & Lee, C. Y.** Hypothermic perfusion preservation: the future of organ

- preservation revisited? *Cryobiology* 54, 129–45 (2007).
33. **Belzer, F. O., Glass, N. R., Sollinger, H. W., Hoffmann, R. M. & Southard, J. H.** A new perfusate for kidney preservation. *Transplantation* 33, 322–3 (1982).
 34. **van Golen, R. F., Reiniers, M. J., Olthof, P. B., van Gulik, T. M. & Heger, M.** Sterile inflammation in hepatic ischemia/reperfusion injury: Present concepts and potential therapeutics. *J. Gastroenterol. Hepatol.* 28, 394–400 (2013).
 35. **Torres Crigna, A. et al.** Stem/Stromal Cells for Treatment of Kidney Injuries With Focus on Preclinical Models. *Front. Med.* 5, 179 (2018).
 36. **Southard, J. H. & Belzer, F. O.** Organ preservation. *Annu. Rev. Med.* 46, 235–47 (1995).
 37. **Upadhy, G. A. & Strasberg, S. M.** Glutathione, lactobionate, and histidine: cryptic inhibitors of matrix metalloproteinases contained in University of Wisconsin and histidine/tryptophan/ketoglutarate liver preservation solutions. *Hepatology* 31, 1115–22 (2000).
 38. **Pokorny, H. et al.** Histidine-tryptophan-ketoglutarate solution for organ preservation in human liver transplantation-a prospective multi-centre observation study. *Transpl. Int.* 17, 256–60 (2004).
 39. **Rayya, F. et al.** Comparison of histidine-tryptophan-ketoglutarate solution and University of Wisconsin solution in adult liver transplantation. *Transplant. Proc.* 40, 891–4 (2008).
 40. **Veres, G. et al.** TiProtec preserves endothelial function in a rat model. *J. Surg. Res.* 200, 346–355 (2016).
 41. **Meine, M. H. et al.** Comparison Between IGL-1 and HTK Preservation Solutions in Deceased Donor Liver Transplantation. *Transplant. Proc.* 47, 888–93 (2015).
 42. **O’Callaghan, J. M., Morgan, R. D., Knight, S. R. & Morris, P. J.** The effect of preservation solutions for storage of liver allografts on transplant outcomes: a systematic review and meta-analysis. *Ann. Surg.* 260, 46–55 (2014).
 43. **Adam, R. et al.** Compared Efficacy of Preservation Solutions in Liver Transplantation: A Long-Term Graft Outcome Study From the European Liver Transplant Registry. *Am. J. Transplant.* 15, 395–406 (2015).
 44. **Stefanovich, P. et al.** Effects of Hypothermia on the Function, Membrane Integrity, and Cytoskeletal Structure of Hepatocytes. *Cryobiology* 32, 389–403 (1995).
 45. **Mack, J. E., Kerr, J. A., Vreugdenhil, P. K., Belzer, F. O. & Southard, J. H.** Effect of polyethylene glycol on lipid peroxidation in cold-stored rat hepatocytes. *Cryobiology* 28, 1–7 (1991).
 46. **Pulis, R. P., Wu, B. M., Kneteman, N. M. & Churchill, T. A.** Conservation of phosphorylation state of cardiac phosphofructokinase during in vitro

- hypothermic hypoxia. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 279, H2151-8 (2000).
47. **Weinberg, J. M., Davis, J. A., Abarzua, M. & Rajan, T.** Cytoprotective effects of glycine and glutathione against hypoxic injury to renal tubules. *J. Clin. Invest.* 80, 1446–1454 (1987).
48. **Marsh, D. C., Hjelmhaug, J. A., Vreugdenhil, P. K., Belzer, F. O. & Southard, J. H.** Glycine prevention of cold ischemic injury in isolated hepatocytes. *Cryobiology* 28, 105–9 (1991).
49. **Schemmer, P. et al.** Intravenous glycine improves survival in rat liver transplantation. *Am. J. Physiol. Liver Physiol.* 276, G924–G932 (1999).
50. **Belzer, F. O., Ashby, B. S. & Dunphy, J. E.** 24-hour and 72-hour preservation of canine kidneys. *Lancet (London, England)* 2, 536–8 (1967).
51. **Collins, G. M., Bravo-Shugartman, M. & Terasaki, P. I.** Kidney preservation for transportation. Initial perfusion and 30 hours' ice storage. *Lancet (London, England)* 2, 1219–22 (1969).
52. **Guarrera, J. V et al.** Hypothermic machine perfusion of liver grafts for transplantation: technical development in human discard and miniature swine models. *Transplant. Proc.* 37, 323–5 (2005).
53. **Vekemans, K., Liu, Q., Pirenne, J. & Monbaliu, D.** Artificial Circulation of the Liver: Machine Perfusion as a Preservation Method in Liver Transplantation. *Anat. Rec. Adv. Integr. Anat. Evol. Biol.* 291, 735–740 (2008).
54. **Laing, R. W., Mergental, H. & Mirza, D. F.** Normothermic ex-situ liver preservation. *Curr. Opin. Organ Transplant.* 22, 274–280 (2017).
55. **Manekeller, S. & Minor, T.** Possibility of conditioning predamaged grafts after cold storage: influences of oxygen and nutritive stimulation. *Transpl. Int.* 19, 667–674 (2006).
56. **Rodriguez-Martínez, D. et al.** [Technical aspects of isolated organ perfusion devices]. *Actas Urol. Esp.* 32, 59–66 (2008).
57. **Karangwa, S. A. et al.** Machine Perfusion of Donor Livers for Transplantation: A Proposal for Standardized Nomenclature and Reporting Guidelines. *Am. J. Transplant* 16, 2932–2942 (2016).
58. **Schlegel, A., Muller, X. & Dutkowski, P.** Hypothermic liver perfusion. *Curr. Opin. Organ Transplant.* 22, 563–570 (2017).
59. **Burlage, L. C. et al.** Oxygenated hypothermic machine perfusion after static cold storage improves endothelial function of extended criteria donor livers. *HPB (Oxford)*. 19, 538–546 (2017).
60. **Westerkamp, A. C. et al.** Oxygenated Hypothermic Machine Perfusion After Static Cold Storage Improves Hepatobiliary Function of Extended Criteria Donor Livers. *Transplantation* 100, 825–835 (2016).

61. **Stegemann, J. & Minor, T.** Energy charge restoration, mitochondrial protection and reversal of preservation induced liver injury by hypothermic oxygenation prior to reperfusion. *Cryobiology* 58, 331–6 (2009).
62. **Minor, T., von Horn, C. & Paul, A.** Role of temperature in reconditioning and evaluation of cold preserved kidney and liver grafts. *Curr. Opin. Organ Transplant.* 22, 267–273 (2017).
63. **Guarrera, J. V. et al.** Hypothermic Machine Preservation in Human Liver Transplantation: The First Clinical Series. *Am. J. Transplant.* 10, 372–381 (2010).
64. **van Rijn, R. et al.** Dual hypothermic oxygenated machine perfusion in liver transplants donated after circulatory death. *Br. J. Surg.* 104, 907–917 (2017).
65. **Clavien, P.-A. & Dutkowski, P.** Advances in Hypothermic Perfusion S52 | Supplement Clavien and Dutkowski. (2017). doi:10.1002/lt.24844
66. **Hessheimer, A. J. & Fondevila, C.** Liver perfusion devices: how close are we to widespread application? *Curr. Opin. Organ Transplant.* 22, 105–111 (2017).
67. **Burra, P., Zanetto, A., Russo, F. & Germani, G.** Organ Preservation in Liver Transplantation. *Semin. Liver Dis.* 38, 260–269 (2018).
68. **Bruinsma, B. G. et al.** Subnormothermic Machine Perfusion for *Ex Vivo* Preservation and Recovery of the Human Liver for Transplantation. *Am. J. Transplant.* 14, 1400–1409 (2014).
69. **Selten, J., Schlegel, A., de Jonge, J. & Dutkowski, P.** Hypo- and normothermic perfusion of the liver: Which way to go? *Best Pract. Res. Clin. Gastroenterol.* 31, 171–179 (2017).
70. **Spetzler, V. N. et al.** Subnormothermic ex vivo liver perfusion is a safe alternative to cold static storage for preserving standard criteria grafts. *Liver Transpl.* 22, 111–9 (2016).
71. **Hoyer, D. P. et al.** Controlled Oxygenated Rewarming of Cold Stored Livers Prior to Transplantation: First Clinical Application of a New Concept. *Transplantation* 100, 147–52 (2016).
72. **Bruinsma, B. G. & Uygün, K.** Subzero organ preservation: the dawn of a new ice age? *Curr. Opin. Organ Transplant.* 22, 281–286 (2017).
73. **Berendsen, T. A. et al.** Supercooling enables long-term transplantation survival following 4 days of liver preservation. *Nat. Med.* 20, 790–3 (2014).
74. **Liu, Q. et al.** Perfusion defatting at subnormothermic temperatures in steatotic rat livers. *Transplant. Proc.* 45, 3209–13 (2013).
75. **Ravikumar, R. et al.** Liver Transplantation After *Ex Vivo* Normothermic Machine Preservation: A Phase 1 (First-in-Man) Clinical Trial. *Am. J. Transplant.* 16, 1779–1787 (2016).

76. **Liu, Q. et al.** Ex situ 86-hour liver perfusion: Pushing the boundary of organ preservation. *Liver Transpl.* 24, 557–561 (2018).
77. **Nasralla, D. et al.** A randomized trial of normothermic preservation in liver transplantation. *Nature* 557, 50–56 (2018).
78. **Mergental, H. et al.** Transplantation of Declined Liver Allografts Following Normothermic Ex-Situ Evaluation. *Am. J. Transplant* 16, 3235–3245 (2016).
79. **Hosgood, S. A., Nicholson, H. F. L. & Nicholson, M. L.** Oxygenated Kidney Preservation Techniques. *Transplantation* 93, 455–459 (2012).
80. **'t Hart, N. A. et al.** Hypothermic machine perfusion of the liver and the critical balance between perfusion pressures and endothelial injury. *Transplant. Proc.* 37, 332–4 (2005).
81. **Fujita, S., Hamamoto, I., Nakamura, K., Tanaka, K. & Ozawa, K.** Evaluation of oxygen necessity during hypothermic liver perfusion. *Nihon Geka Hoka.* 62, 228–40 (1993).
82. **Rodriguez, J. V et al.** A device to measure oxygen consumption during the hypothermic perfusion of the liver. *Cryo Letters* 30, 335–46
83. **Hosgood, S. A., Yang, B., Bagul, A., Mohamed, I. H. & Nicholson, M. L.** A comparison of hypothermic machine perfusion versus static cold storage in an experimental model of renal ischemia reperfusion injury. *Transplantation* 89, 830–7 (2010).
84. **Vekemans, K. et al.** Influence of flow and addition of oxygen during porcine liver hypothermic machine perfusion. *Transplant. Proc.* 39, 2647–51 (2007).
85. **Tojimbara, T. et al.** Liver transplantation from non-heart beating donors in rats: influence of viscosity and temperature of initial flushing solutions on graft function. *Liver Transpl. Surg.* 3, 39–45 (1997).
86. **van der Plaats, A. et al.** Effect of University of Wisconsin organ-preservation solution on haemorheology. *Transpl. Int.* 17, 227–33 (2004).
87. **Woodcock, T.** Plasma volume, tissue oedema, and the steady-state Starling principle. *BJA Educ.* 17, 74–78 (2017).
88. **Weisberg, H. F.** Osmotic pressure of the serum proteins. *Ann. Clin. Lab. Sci.* 8, 155–64
89. **Hoffmann, R. M., Southard, J. H., Lutz, M., Mackety, A. & Belzer, F. O.** Synthetic perfusate for kidney preservation. Its use in 72-hour preservation of dog kidneys. *Arch. Surg.* 118, 919–21 (1983).
90. **Kalayoglu, M. et al.** Extended preservation of the liver for clinical transplantation. *Lancet (London, England)* 1, 617–9 (1988).
91. **Jamieson, N. V et al.** Preservation of the canine liver for 24-48 hours using

- simple cold storage with UW solution. *Transplantation* 46, 517–22 (1988).
92. **Cofer, J. B. et al.** A comparison of UW with Eurocollins preservation solution in liver transplantation. *Transplantation* 49, 1088–93 (1990).
 93. **Sputtek, A., Horn, E.-P., Schulte am Esch, J. & Kühnl, P.** Kryokonservierung von Erythrozyten mit Hydroxyethylstärke (HES) - Vom Laborversuch zur klinischen Anwendung. *Zeitschrift für Intensivmedizin und Notfallmedizin* 36, 162–164 (2001).
 94. **García-Valdecasas, J. C. et al.** Liver conditioning after cardiac arrest: the use of normothermic recirculation in an experimental animal model. *Transpl. Int.* 11, 424–32 (1998).
 95. **McAnulty, J. F.** Hypothermic organ preservation by static storage methods: Current status and a view to the future. *Cryobiology* 60, S13-9 (2010).
 96. **Ar'Rajab, A., Ahrén, B., Sundberg, R. & Bengmark, S.** The function of a colloid in liver cold-storage preservation. *Transplantation* 52, 34–8 (1991).
 97. **F.A. Pascucci.** Preservación de hígados mediante la técnica de perfusión hipotérmica. Efectos sobre el consumo de oxígeno y la viabilidad tisular en hipotermia. (Universidad Nacional de Rosario, 2010).
 98. **'t Hart, N. A. et al.** Oxygenation during hypothermic rat liver preservation: an in vitro slice study to demonstrate beneficial or toxic oxygenation effects. *Liver Transpl.* 11, 1403–11 (2005).
 99. **Schlegel, A., Graf, R., Clavien, P.-A. & Dutkowski, P.** Hypothermic oxygenated perfusion (HOPE) protects from biliary injury in a rodent model of DCD liver transplantation. *J. Hepatol.* 59, 984–91 (2013).
 100. **Bruinsma, B. G. et al.** Supercooling preservation and transplantation of the rat liver. *Nat. Protoc.* 10, 484–494 (2015).
 101. **Moore, D. E. et al.** Impact of donor, technical, and recipient risk factors on survival and quality of life after liver transplantation. *Arch. Surg.* 140, 273–7 (2005).
 102. **Meine, M. H. et al.** Randomized clinical assay for hepatic grafts preservation with University of Wisconsin or histidine-tryptophan-ketoglutarate solutions in liver transplantation. *Transplant. Proc.* 38, 1872–5 (2006).
 103. **Carnevale, M. E., Balaban, C. L., Guibert, E. E., Bottai, H. & Rodriguez, J. V.** Hypothermic machine perfusion versus cold storage in the rescuing of livers from non-heart-beating donor rats. *Artif. Organs* 37, 985–91 (2013).
 104. **Dutkowski, P. et al.** First Comparison of Hypothermic Oxygenated PERfusion Versus Static Cold Storage of Human Donation After Cardiac Death Liver Transplants: An International-matched Case Analysis. *Ann. Surg.* 262, 764-70; discussion 770–1 (2015).

105. **Panisello-Roselló, A. et al.** Cytoprotective Mechanisms in Fatty Liver Preservation against Cold Ischemia Injury: A Comparison between IGL-1 and HTK. *Int. J. Mol. Sci.* 19, 348 (2018).
106. **Pascucci, F. et al.** 55. Evaluation of a new solution for hypothermic machine perfusion (HMP) of the liver. I – Composition and physicochemical parameters. *Cryobiology* 65, 357 (2012).
107. **Rasmussen, H. N. & Rasmussen, U. F.** Oxygen solubilities of media used in electrochemical respiration measurements. *Anal. Biochem.* 319, 105–13 (2003).
108. **Llarrull, M. S. et al.** Cold preservation of isolated hepatocytes in UW solution: experimental studies on the respiratory activity at 0 degrees C. *Cryo Letters* 28, 313–28
109. © Servicio Meteorológico Nacional. 1872 - 2019. Servicio Meteorológico Nacional. Available at: <https://www.smn.gob.ar/>.
110. **Nave, C. R. G. S. U.** HyperPhysics. (2010). Available at: <http://hyperphysics.phy-astr.gsu.edu/hbasees/hframe.html>.
111. **Carnevale, M. E., Balaban, C. L., Guibert, E. E., Bottai, H. & Rodríguez, J. V.** 56. Evaluation of a new solution for hypothermic machine perfusion (HMP) of the liver. II – A study in the perfused rat liver in vitro. *Cryobiology* 65, (2012).
112. **Bessems, M. et al.** The isolated perfused rat liver: standardization of a time-honoured model. *Lab. Anim.* 40, 236–46 (2006).
113. **Rodríguez, J. V., Guibert, E. E., Quintana, A., Scandizzi, A. & Almada, L.** Role of sodium nitroprusside in the improvement of rat liver preservation in University of Wisconsin solution: A study in the isolated perfused liver model. *J. Surg. Res.* 87, 201–8 (1999).
114. **Erich Gnaiger.** Oxygen Calibration and Solubility in Experimental Media. 1–12 (2010). doi:[www.orooboros.at](https://doi.org/10.1002/9780470747919.ch39)
115. **Butterworth, R. F. & Vaquero, J.** Hepatic Encephalopathy. in *The Liver* 597–617 (John Wiley & Sons, Ltd). doi:[10.1002/9780470747919.ch39](https://doi.org/10.1002/9780470747919.ch39)
116. **Rahmatullah, M. & Boyde, T. R.** Improvements in the determination of urea using diacetyl monoxime; methods with and without deproteinisation. *Clin. Chim. Acta.* 107, 3–9 (1980).
117. **Butler, A. R., Hussain, I. & Leitch, E.** The chemistry of the diacetyl monoxime assay of urea in biological fluids. *Clin. Chim. Acta.* 112, 357–60 (1981).
118. **Quintana, A. B., Guibert, E. E. & Rodríguez, J. V.** Effect of cold preservation/reperfusion on glycogen content of liver. Concise review. *Ann. Hepatol.* 4, 25–31 (2005).
119. **Carr, R. S. & Neff, J. M.** Quantitative semi-automated enzymatic assay for tissue glycogen. *Comp. Biochem. Physiol. B.* 77, 447–9 (1984).

120. **Pizarro, M. D. et al.** Protective effects of a carbon monoxide-releasing molecule (CORM-3) during hepatic cold preservation. *Cryobiology* 58, 248–55 (2009).
121. **Schleimer, K. et al.** Improved technique of heterotopic auxiliary rat liver transplantation with portal vein arterialization. *Langenbeck's Arch. Surg.* 391, 102–7 (2006).
122. **Aller, M.-A. et al.** The value of microsurgery in liver research. *Liver Int.* 29, 1132–40 (2009).
123. **Aller, M.-A. et al.** A half century (1961-2011) of applying microsurgery to experimental liver research. *World J. Hepatol.* 4, 199–208 (2012).
124. **Camargo, C. A., Madden, J. F., Gao, W., Selvan, R. S. & Clavien, P. A.** Interleukin-6 protects liver against warm ischemia/reperfusion injury and promotes hepatocyte proliferation in the rodent. *Hepatology* 26, 1513–20 (1997).
125. **Abu-Amara, M. et al.** Role of endothelial nitric oxide synthase in remote ischemic preconditioning of the mouse liver. *Liver Transplant.* 17, 610–619 (2011).
126. **Fuller, B. J. & Attenburrow, V. D.** The effects of increasing the oncotic and osmotic pressure of the perfusate on bloodless hypothermic perfusion of liver in the rat. *Cryobiology* 15, 545–50 (1978).
127. **Fuller, B., Froghi, F. & Davidson, B.** Organ preservation solutions. *Curr. Opin. Organ Transplant.* 23, 361–368 (2018).
128. **Pasut, G. et al.** Polyethylene glycols: An effective strategy for limiting liver ischemia reperfusion injury. *World J. Gastroenterol.* 22, 6501 (2016).
129. **Carnevale M.E., Lausada N., Juan de Paz L., Stringa P., Rumbo M., Guibert E.E., Tiribelli C., Gondolessi G.E., R. J. V.** Comparison of the novel preservation solution BGP-HMP vs HTK solution for static cold storage (SCS) of rat livers. *Liver Transplant.*
130. **Balaban, C. L., Rodriguez, J. V. & Guibert, E. E.** Delivery of the Bioactive Gas Hydrogen Sulfide During Cold Preservation of Rat Liver: Effects on Hepatic Function in an Ex vivo Model. *Artif. Organs* 35, 508–515 (2011).
131. **He, X.-S. et al.** Safe time to warm ischemia and posttransplant survival of liver graft from non-heart-beating donors. *World J. Gastroenterol.* 10, 3157–60 (2004).
132. **Yuan, X. et al.** Machine perfusion or cold storage in organ transplantation: indication, mechanisms, and future perspectives. *Transpl. Int.* 23, 561–570 (2010).
133. **Ikeda, T. et al.** Ischemic injury in liver transplantation: difference in injury sites between warm and cold ischemia in rats. *Hepatology* 16, 454–61 (1992).

134. **Li, X., Elwell, M. R., Ryan, A. M. & Ochoa, R.** Morphogenesis of postmortem hepatocyte vacuolation and liver weight increases in Sprague-Dawley rats. *Toxicol. Pathol.* 31, 682–8 (2003).
135. **Montalvo-Jave, E. E., Escalante-Tattersfield, T., Ortega-Salgado, J. A., Piña, E. & Geller, D. A.** Factors in the Pathophysiology of the Liver Ischemia-Reperfusion Injury. *J. Surg. Res.* 147, 153–159 (2008).
136. **Nashan, B., Spetzler, V., Schemmer, P., Kirste, G. & Rahmel, A.** Regarding “Compared Efficacy of Preservation Solutions in Liver Transplantation: A Long-Term Graft Outcome Study From the European Liver Transplant Registry”. *Am. J. Transplant.* 15, 3272–3273 (2015).
137. **Adam, R., Delvart, V. & Karam, V.** Reply to Letter Regarding “Compared Efficacy of Preservation Solutions in Liver Transplantation: A Long-Term Graft Outcome Study From the European Liver Transplant Registry”. *Am. J. Transplant.* 15, 3274–3275 (2015).
138. **Adam, R., Astarcioglu, I., Gigou, M., Isaac, J. & Bismuth, H.** The influence of the glycogen content of the donor liver on subsequent graft function and survival in rat liver transplantation. *Transplantation* 54, 753–6 (1992).
139. **Hölzen, J. P., Palmes, D., Langer, M. & Spiegel, H. U.** Microsurgical training curriculum for learning kidney and liver transplantation in the rat. *Microsurgery* 25, 614–23 (2005).
140. **Lausada, N. R., Gondolessi, G. E., Ortiz, E., Dreizzen, E. & Raimondi, J. C.** [Orthotopic liver transplant in rats. Surgical technique, complications and treatment]. *Acta Gastroenterol. Latinoam.* 32, 63–70 (2002).
141. **Guarrera, J. V et al.** Hypothermic machine preservation attenuates ischemia/reperfusion markers after liver transplantation: preliminary results. *J. Surg. Res.* 167, e365-73 (2011).